

UNIVERSIDAD DE GRANADA
HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ANTITUMORALES
DE UN EXTRACTO DE CALÉNDULA:
PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS Y
CITOTÓXICAS**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ANTITUMORALES
DE UN EXTRACTO DE CALÉNDULA:
PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS Y
CITOTÓXICAS**

Memoria presentada por D. Eva M^a Jiménez
Medina para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Granada

Granada, Mayo 2006

Dr. D. Angel Miguel García-Lora, Doctor en Ciencias Químicas, Investigador del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada

CERTIFICA: Que el presente trabajo titulado “**Estudio de las actividades antitumorales de un extracto de *caléndula*: propiedades inmunomoduladoras y citotóxicas**”, ha sido realizado bajo mi dirección por D^a Eva M^a Jiménez Medina, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste, se firma el presente certificado

Fdo. Angel Miguel García-Lora

D. Federico Garrido Torres-Puchol, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Inmunología del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad de Granada y Jefe de Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

CERTIFICA: Que el presente trabajo titulado “**Estudio de las actividades antitumorales de un extracto de *caléndula*: propiedades inmunomoduladoras y citotóxicas**”, ha sido realizado bajo mi dirección por D^a Eva M^a Jiménez Medina, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste, se firma el presente certificado

Fdo. Federico Garrido Torres-Puchol

*A Alfonso,
a mis padres y
a mi hermana*

Agradecimientos

Al Dr. Angel García-Lora, Director de esta tesis, por el estímulo, ánimo y apoyo que me ha transmitido en todo momento y que ha servido para convertir este trabajo en realidad.

Al Dr. Federico Garrido, Director de esta tesis, por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección.

A Marisol y Laura porque no sólo han sido grandes compañeras, sino grandes amigas.

A todas las personas que de alguna u otra forma han colaborado en la realización de esta tesis.

De esta tesis se han derivado las siguientes publicaciones:

Artículo:

- A new extract of the plant *calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation (2006). E. Jiménez-Medina, A. García-Lora, I. Algarra, A. Collado, F. Garrido. *BMC Cáncer*, 6: 119.

Artículo relacionado:

- Identification of the protein components of protein-bound polysaccharide (PSK) that interact with NK cells. E. Jiménez, García-Lora, M. Martínez, F. Garrido (2005). *Cancer Immunology Immunotherapy*, 54: 395-399.

Comunicaciones a congresos internacionales:

- PF2: a new immunomodulator acting on lymphocyte cell proliferation (2004). E. Jiménez-Medina, M.S Martínez, L. Paco, I. Algarra, A. García-Lora, F. Garrido. *Genes and Immunity*, 5.

- A new *caléndula* extract enhanced lymphocyte cell proliferation (2005). E. Jiménez-Medina, M.S Martínez, A Schanoski, G. Salaya, L. Paco, A. García-Lora, F. Garrido. *Genes and Immunity*, 6.

- A new *caléndula* extract with immunomodulatory activity shows *in vitro* growth inhibition of tumour cell lines (2005). E. Jiménez-Medina, L. Paco, A Schanoski, G. Salaya, M.S Martínez, A. García-Lora, F. Garrido. *Genes and Immunity*, 6.

- Un nuevo extracto de *caléndula* muestra *in vitro* actividad mitogénica sobre PBLs y actividad citotóxica sobre células tumorales (2005). E. Jiménez-Medina, M.S Martínez, A. García-Lora, L. Paco, I. Algarra, A. Collado, F. Garrido. *Clinical & Translational Oncology*, 7: 598.

Comunicaciones a congresos nacionales:

- PF-2: Un nuevo inmunomodulador que actúa sobre la proliferación de linfocitos (2004). E. Jiménez-Medina, M.S

Martínez, L. Paco, A. García-Lora, F. Garrido. *Inmunología*, 23: 156.

- Un extracto de *caléndula* con actividad inmunomoduladora muestra in vitro inhibición del crecimiento de líneas tumorales (2005). E. Jiménez-Medina, L. Paco, G. Salaya, Schanoski A, M.S Martínez, A. García-Lora, F. Garrido. *Inmunología*, 24: 105.

- Un nuevo extracto de *caléndula* induce la proliferación de linfocitos (2005). E. Jiménez-Medina, G. Salaya, L. Paco, A Schanoski, M.S Martínez, A. García-Lora, F. Garrido. *Inmunología*, 24: 125.

INDICE

Introducción

1.- Cáncer como enfermedad.....	3
2.- Ciclo celular.....	10
2.1.- Control del ciclo celular y cáncer.....	19
2.1.1.- Mutación de protooncogenes: oncogenes.....	21
2.1.2.- Mutación de genes supresores de tumores.....	23
3.- Apoptosis.....	26
4.- Tratamientos del cáncer	
4.1.- Tratamientos tradicionales.....	31
4.1.1.- Radioterapia.....	31
4.1.2.- Quimioterapia.....	33
4.2.- Inmunoterapia.....	39
5.- Agentes antitumorales derivados de plantas (fitoquímicos antitumorales)	
5.1.- Citotóxicos.....	44
5.2.- Inmunomoduladores.....	46
6.- Caléndula.....	51

Objetivos.....	55
-----------------------	-----------

Material y métodos

1.- Material y soluciones de uso general.....	61
1.1.- Material.....	61
1.2.- Tampones, medios y soluciones.....	62
2.- Extracto de caléndula (LACE: laser activated caléndula extract).....	62
3.- Cultivos celulares	
3.1.- Líneas celulares.....	63
3.2.- Métodos de cultivo celular.....	64

3.3.- Congelación de las células.....	65
3.4.- Lavado de las células.....	66
4.- Animales.....	66
5.- Proliferación <i>in vitro</i> de linfocitos de sangre periférica de humanos (PBLs) tratados con LACE.....	66
6.- Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i>	68
7.- Análisis de las fases del ciclo celular.....	70
8.- Ensayo de anexina-V para detectar células apoptóticas.....	72
9.- Expresión de caspasa-3.....	73
10.- Detección de expresión de ciclinas.....	74
11.- Análisis de factores transcripcionales implicados en el ciclo celular.....	74
12.- Western-Blot.....	76
13.- Estudio de subpoblaciones de PBLs tratados con LACE.....	77
14.- Ensayos <i>in vivo</i>	
14.1.- Protocolo de toxicidad <i>in vivo</i>	78
14.2.- Estudio de subpoblaciones de linfocitos de ratón tratados con LACE.....	78
14.3.- Crecimiento local en ratones inmunocompetentes.....	80
14.4.- Crecimiento local en ratones atímicos.....	81

Resultados

1.- Proliferación <i>in vitro</i> de linfocitos tratados con LACE.....	85
2.- Estudio del ciclo celular de PBLs.....	88
3.- Análisis <i>in vitro</i> de subpoblaciones de PBLs activadas por LACE.....	90
4.- Efecto de LACE sobre el crecimiento de líneas celulares tumorales.....	92
5.- Estudio de las fases del ciclo celular en células tumorales.....	99
6.- Identificación de apoptosis con anexina V.....	102
7.- Análisis de expresión de caspasa-3.....	104

8.- Análisis de proteínas implicadas en el ciclo celular.....	106
9.- Toxicidad de LACE en ratones.....	111
10.- Toxicidad de LACE en ratas.....	112
11.- Subpoblaciones de linfocitos inducidas por LACE en ratones.....	114
12.- Crecimiento local en ratones inmunocompetentes.....	116
13.- Crecimiento local y supervivencia en ratones atímicos.....	118
Discusión.....	123
Conclusiones.....	139
Bibliografía.....	143

Introducción

1.- Cáncer como enfermedad

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la existencia de una proliferación anormal de células con capacidad para invadir órganos y tejidos y diseminarse a distancia, dando origen a las metástasis. El proceso de metástasis es largo y complejo ya que las células cancerosas primero deben invadir un tejido cercano, y luego llegar al flujo sanguíneo o a un vaso linfático para migrar a una nueva zona del cuerpo y establecer una nueva colonia. Las fases en la producción de una metástasis son las siguientes: desprendimiento, invasión, penetración vascular, transporte intravascular, embolización con muerte celular y embolización con crecimiento (colonización) (Fidler y cols, 1982; Mareel y cols, 1990).

El cáncer se considera una enfermedad genética, resultado de las alteraciones que presentan las células cancerosas en genes relacionados con el control del ciclo celular. Durante este proceso de transformación de las células normales a células cancerosas, ocurren varias alteraciones genéticas dando lugar a una pérdida del control de los mecanismos de replicación y reparación del DNA, así como de la segregación del material genético (Kastan y cols, 2004; Ford y cols, 2004). Aunque las células normales tienen estrategias de defensa (reparación del DNA, genes supresores de tumores, sistema inmune,...) contra el desarrollo del cáncer, las células tumorales activan diferentes vías de escape que permiten la progresión de la neoplasia. El estudio del ciclo celular y su regulación han permitido conocer como la integridad de la replicación del genoma son mantenidas por las funciones coordinadas de los puntos de control y de los sistemas

de reparación del DNA (Kastan y cols, 2004). El funcionamiento adecuado de estos procesos puede ser alterado por mutaciones genéticas.

Estudios recientes han permitido enfocar la investigación del cáncer hacia la identificación de algunos de sus factores etiológicos. En la identificación y control de componentes ambientales radica la esperanza de la prevención del cáncer. La prevención primaria y la detección de lesiones precursoras son las únicas armas disponibles para contener el aumento de la incidencia de los tumores malignos. Además los hallazgos de mecanismos moleculares de regulación, que participan en la transformación celular, pueden ser empleados como sistemas potenciales para instrumentar nuevas terapias contra el desarrollo del cáncer.

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados, en los que una de cada cuatro personas fallece debido a esta enfermedad. En el año 2002 se diagnosticaron en el mundo aproximadamente 10.900.000 nuevos casos de cáncer (5.800.000 hombres y 5.100.000 mujeres) (Bingham y cols, 2003). El mayor número de enfermos se diagnosticó en Asia (4.900.000), pero las mayores tasas de incidencia, en ambos sexos, se presentaron en Norteamérica y Australia. Considerando ambos sexos, el cáncer más frecuente es el de pulmón (1.352.000 casos) seguido del de mama (1.151.000), los colorrectales (1.023.000), estómago (933.000), próstata (679.000), hígado (626.000), cérvix (494.000) y esófago (462.000) (Bingham y cols, 2003). En este año murieron en el mundo aproximadamente 6.700.000 personas por cáncer (3.796.000 hombres y 2.928.000 mujeres). El mayor número de muertes se produjo en Asia (50%), pero las mayores tasas de mortalidad se dan en Europa para el sexo masculino, y

en Norteamérica, Sureste de África y Norte de Europa para el femenino (Ferlay y cols, 2004).

Los cánceres más frecuentes en el sexo femenino son (por este orden): mama, cérvix, colorrectales y pulmón (**Tabla 1**). En el masculino los de pulmón, estómago, próstata y colorrectales (**Tabla 2**). Aparte de las diferencias asociadas al sexo en la incidencia del cáncer, existen también diferencias regionales relevantes. Por ejemplo, la mortalidad por cáncer en los hombres en el año 2000 fue ocho veces superior en Bélgica que en Paraguay. Estas diferencias pueden darse incluso en un mismo país. Por ejemplo, entre 1996 y 2002, la mortalidad por cáncer de mama en el estado de Louisiana (EE.UU.) fue aproximadamente 20 veces superior que en Arizona. Estas cifras demuestran claramente que los factores ambientales influyen en la incidencia del cáncer. De forma similar, los estudios realizados en grupos que se habían mudado de una zona geográfica a otra muestran que las diferencias étnicas (genéticas) son responsables en un menor grado de la variación en la incidencia del cáncer. En cambio, la modificación del entorno y los distintos modos de vida, reflejados en la alimentación, la bebida y el tabaquismo, parecen ser un factor decisivo.

Tabla 1 y 2: Tipos más frecuentes de cáncer. Distribución en porcentajes de los nuevos casos de cáncer y de las muertes en todo el mundo, referidos al año 2000. **Tabla 1**, según el tipo de cáncer en mujeres. En la **Tabla 2**, según el tipo de cáncer en varones. Fuente: Parkin, D.M. Lancet Oncol 2001; 2: 533-543.

Localización	Nuevos casos	Muertes
Mama	22	14
Cuello	10	9
Colon y recto	9	9
Pulmón	7	11
Estómago	7	9
Hígado	4	6
Ovario	4	4
Esófago	3	4
Linfoma no Hodgkin	3	3
Páncreas	2	4
Leucemia	2	3
Cavidad oral	2	2
Vejiga	2	1
Otros órganos	21	20

Tabla 1

Localización	Nuevos casos	Muertes
Pulmón	17	23
Estómago	11	12
Próstata	10	6
Colon y recto	9	7
Hígado	8	11
Esófago	5	6
Vejiga	5	3
Leucemia	3	3
Linfoma no Hodgkin	3	3
Cavidad oral	3	2
Páncreas	2	3
Riñón	2	2
Otros órganos	22	19

Tabla 2

En España cada año se diagnostican 162.000 nuevos casos de enfermedad tumoral. El cáncer se ha convertido en la primera causa de muerte global en España desde 1999, al igual que ha pasado en Estados Unidos, por delante de las enfermedades cardiovasculares. En mujeres, aún se sitúa en segundo lugar después de las enfermedades cardiovasculares, aunque en las mujeres del grupo de edad entre 20 y 39 años, también es la primera causa de muerte al igual que en los hombres. En el año 2003, la mortalidad por cáncer producía 94.123 defunciones, 59.520 en hombres y 34.603 en mujeres **(Figura 1)**. Esta cifra representa el 24% de todas las defunciones, lo que supone que una de cada cuatro personas fallece a consecuencia de una enfermedad tumoral (Berrino y cols, 2003). El carcinoma colorrectal, con 25.665 casos al año, es el tumor más frecuente en nuestro país y el que más ha aumentado en los últimos años, seguido del cáncer de pulmón con 18.821 nuevos casos anuales, y el cáncer de mama con 15.979 **(Figura 1)**.

En hombres los tumores responsables del mayor número de muertes son, por orden decreciente de frecuencia: pulmón, colorrectal, próstata, estómago y vejiga; superando todos ellos las 5000 muertes/año. En mujeres, el cáncer de mama ocasiona la mayor mortalidad, seguida del colorrectal, estómago, páncreas y pulmón. Sin embargo, el estudio refleja una importante disminución en la mortalidad por cáncer de mama, que se ha reducido en los últimos 10 años a un ritmo anual del 1.4%.

El mayor número de pacientes con cáncer tienen entre 65 y 75 años. Entre los 30 y los 45 años hay más mujeres que hombres entre los enfermos, debido sin duda a la frecuencia de cáncer de mama en estas edades (López-Abente y cols, 2005).



Figura 1: Incidencia y mortalidad por cáncer en España, en el año 2003. Fuente Eurocare (Berrino y cols, 2003).

Cuando se compara la incidencia de cáncer con la de los países de la UE, en hombres España presenta unas tasas ajustadas superiores a las del promedio de la UE, ocupando el 5º lugar. Sin embargo, en mujeres, España muestra las tasas de incidencia más bajas junto con Grecia (Camí y cols, 2002). La incidencia global en nuestro país se puede considerar media-alta para el sexo masculino (tasa ajustada de la población mundial: 307 casos por cada 100.000 habitantes y año, por detrás de Norteamérica, Australia y Europa del Oeste) y media baja para el femenino (tasa ajustada mundial: 179). En Europa, el cáncer de

pulmón sigue siendo el más frecuente, seguido del de próstata (que representa el 15% de todos los diagnósticos masculinos). Entre las mujeres, el de mama ocupa aún la primera posición, tanto en lo que se refiere a la incidencia (27.4%) como a la mortalidad (130.000 víctimas). Al considerar ambos sexos conjuntamente, el cáncer de pulmón se mantiene a la cabeza; no sólo es el más diagnosticado (13.2%) sino también el más mortífero (20%), seguido de los tumores colorrectales (**Figura 2**).

La mortalidad de cáncer en hombres en España, se sitúa en la media europea, con un total de 243.18 casos por cada 100.000 habitantes, frente a los 250 casos/100.000 habitantes de la UE. Los tumores de vejiga y los de laringe superan en España la tasa de la UE, situándose los primeros en 13.24 casos en España frente a los 10.10 de la UE y los segundos en 8.15 casos frente a 4.68 por cada 100.000 habitantes de la UE. En las mujeres españolas, la tasa de mortalidad por cáncer se encuentra por debajo de la media europea, con un total de 112.8 casos por cada 100.000 habitantes, frente a los 141.23 que presentan los países europeos. El cáncer de cuello uterino es el único tumor que se encuentra igual que la media de la UE.

En cuanto al éxito de las terapias en nuestro país, el último estudio "Eurocare" (European Cancer Registry-based Study on Survival and Care of Cancer Patients), muestra que España ocupa el cuarto puesto en Europa (por detrás de Francia, Austria y Suecia) en cuanto a la tasa de supervivencia de estas enfermedades (Berrino y cols, 2003).

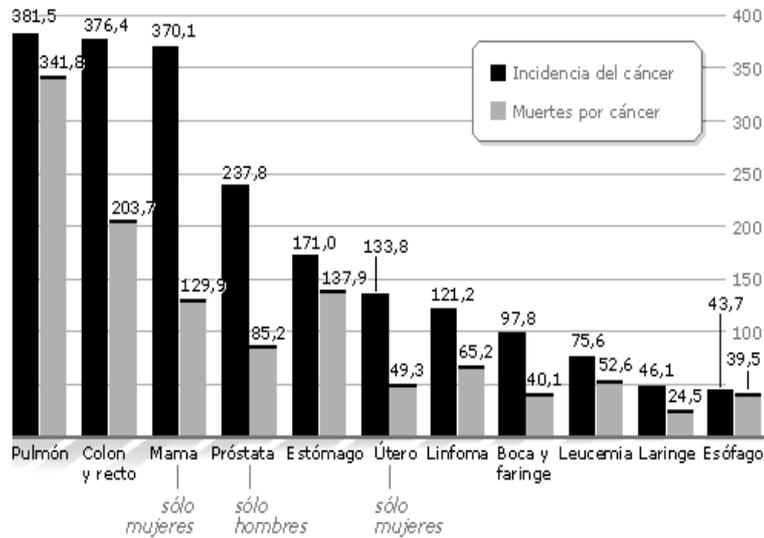


Figura 2: Incidencia y mortalidad en Europa. Datos del artículo "Incidencia y Mortalidad por Cáncer en Europa, 2004", P. Boyle y J. Ferlay, publicado en Anuales de Oncología de la Sociedad Europea de Oncología

2.-Ciclo celular

Una célula tumoral, lo primero que presenta es una alteración del ciclo celular. El ciclo celular es un proceso de gran importancia para la célula ya que tiene como función la formación completa de una nueva célula evitando en lo posible la creación de células con múltiples errores, lo cual le permite al organismo permanecer en un constante equilibrio. El período G_1 llamado

primera fase de crecimiento, se inicia con una célula hija que proviene de la división de la célula madre. La célula aumenta de tamaño y sintetiza nuevo material citoplasmático. En el período S o de síntesis, tiene lugar la duplicación del DNA; en el período G₂ o segunda fase de crecimiento, se sigue sintetizando proteínas y RNA y el final de este queda marcado por la aparición de cambios en la estructura celular. La mitosis es el proceso de división celular por el cual, se conserva la información genética contenida en sus cromosomas, que pasa de esta manera a las sucesivas células a la que la mitosis va a dar origen. El período que transcurre entre dos mitosis, comprende los períodos G₁, S y G₂ y se denomina interfase (**Figura 3**). Mientras que algunas células entran en división tras completar cada interfase, otras pasan a un estado modificado de G₁ llamada fase G₀ o quiescente (Massague, 2004).

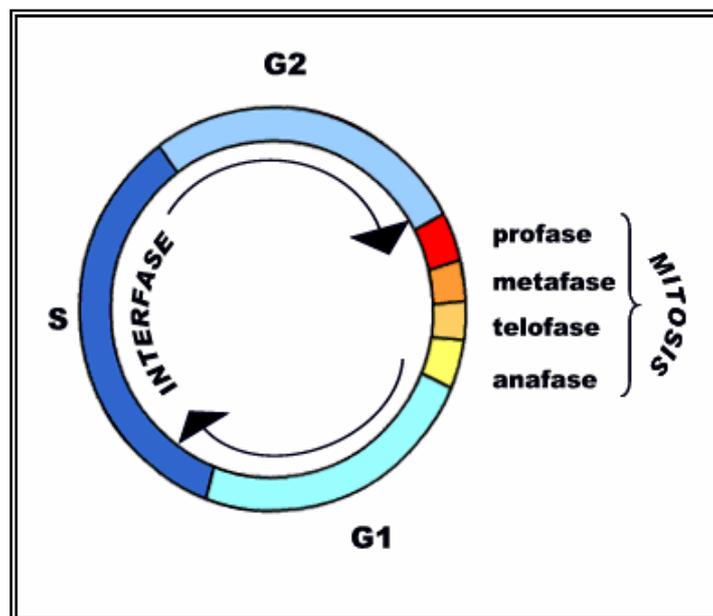


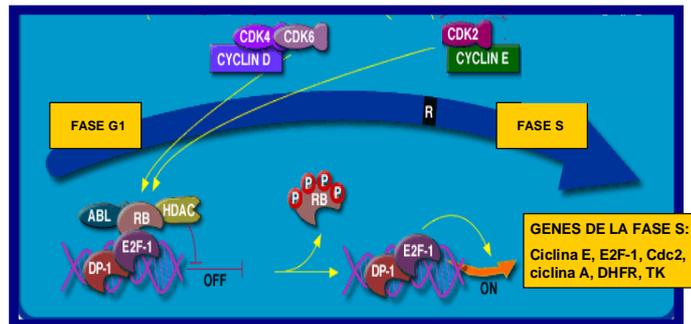
Figura 3: Fases del ciclo celular

El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de cambios en complejos enzimáticos, entre los que se encuentran las ciclinas, las ciclinas dependientes de kinasas (CDK) y los complejos que se forman entre ambas (CDK-ciclinas). La síntesis de estos complejos no es constante porque son inestables, de ahí que la expresión de ellos varíe de acuerdo al momento evolutivo de la fase a la que están asignados (John y cols, 2001; Murray, 2004). Las CDKs constituyen una familia de proteínas con una gran homología de secuencias, que fosforilan residuos de serina y treonina, de proteínas sustrato-específicas, tratándose por tanto de serina/treonina quinasas. Sin embargo, sólo pueden ejercer esa actividad enzimática cuando están asociadas con una ciclina, por ello se las llama quinasas dependientes de ciclinas CDK (cyclin-dependent kinases) (Zarrov y cols, 2002). Los complejos CDK-ciclina dirigen a la célula de una fase a otra del ciclo celular. Por lo tanto, la dinámica del ciclo dependerá de las formas activas o inactivas de los complejos CDK-ciclina, entre otros muchos sucesos. Cuando existe algún daño genético, los mecanismos de control transcripcional de los complejos CDK-ciclina inducen la interrupción del ciclo celular hasta que el daño se corrige.

Las ciclinas del tipo D (D1, D2, D3 y D4) y la ciclina E intervienen regulando el punto de control G₁/S. Ambas se sintetizan durante la fase G₁ y el balance entre síntesis y degradación hace que aparezcan en la célula al final de G₁ y desaparezcan durante la fase S o al acabar esta (Zarrov y cols, 2002). En esta fase el complejo ciclina/CDK fosforila al Retinoblastoma que está normalmente asociado a factores de transcripción de manera que cuando se fosforila libera los factores que participan en la transcripción de genes cuyos productos son

necesarios en la síntesis de DNA (p.e: DHFR, DNA poli α , timidina quinasa) (John y cols, 2001; Murray, 2004) **(Figura 4 y 5)**.

Figura 4: La entrada en ciclo celular es compleja y se inicia con la fosforilización de la proteína retinoblastoma lo que permite liberar el factor de transcripción E2F/DP1. Este fenómeno se encuentra catalizado por la acción de la ciclina D que a su vez necesita acoplarse a la quinasa dependiente de ciclina CDK4/6. Este complejo ciclina D/CDK4/6, se encuentra regulado por genes supresores del grupo p16 y p21. Posteriormente entran en acción en el resto del ciclo celular la ciclina E, la ciclina A y la ciclina B. Figura adaptada de BD Biosciences (www. bd. com).



Así en el avance de la fase G₁ a la de síntesis actúan las ciclinas D asociada a las CDK 2, 4 y 6. En la segunda mitad de G₁ aumenta la presencia de ciclina E con la CDK 2 **(Figura 5)**. La

expresión de ciclina E es dependiente de la familia de E2F (Sears y cols, 2002; Stevaux y cols, 2002). E2F en la fase G₁ se encuentra unido a Rb o a proteínas de la familia de Rb como p107 o p130, cuando se produce la fosforilación del Rb se libera el factor de transcripción E2F el cual es activo (Classon, 2001) **(Figura 4 y 5)**.

Las ciclinas A1, B1 y B2 forman parte de un grupo de ciclinas mitóticas o de la fase G₂/M que se asocian a CDK1 **(Figura 5)**. Se sintetizan durante las fases previas a la mitosis (S o G₂) y se degradan rápida y específicamente durante la mitosis. La ciclina A participa en el control de la replicación del DNA y en la entrada en mitosis (Shtivelman y cols, 2002). En la fase de síntesis actúa la ciclina A con CDK2 y en la fase G₂, la ciclina B con CDK1 **(Figura 5)**.

En la fase G₁ se han podido determinar dos puntos importantes: G₀ (en la mitad de la fase) donde el ciclo puede detenerse, la célula bloquea su crecimiento, pero se mantiene metabólicamente activa; y un punto de restricción (en unión de los 2/3 con 1/3 final de esta fase) en el que puede detenerse el ciclo para corregir defectos celulares, lo que si no se consigue induce el mecanismo de muerte celular. En la fase G₂ también existen elementos de detección de inmadurez celular que inducen la apoptosis cuando la célula no está capacitada para entrar en mitosis (Bulavin y cols, 2002).

Existen otras proteínas que inhiben directamente la actividad de los complejos CDK-ciclina funcionando como oncosupresores, de esta manera, durante el ciclo celular se determina cuando la célula debe entrar en el proceso de autodestrucción o cuando continuar el ciclo y dividirse. Se ejerce así un balance entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido. A estas proteínas se las llama *inhibidores*

de los complejos CDK-ciclina, o CKI y su efecto es por tanto, bloquear el ciclo de división. Las proteínas p21, p27, p57 actúan preferentemente sobre los complejos CDK-ciclina de G₁ y S, y en menor medida, sobre los complejos CDK1-ciclina de G₂. En cambio los inhibidores p16, p15, p18 y p19, actúan específicamente sobre los complejos de ciclinas de G₁ con CDK4 o CDK6, pues compiten con las ciclinas D (Pavletich y cols, 1999) (Figura 5).

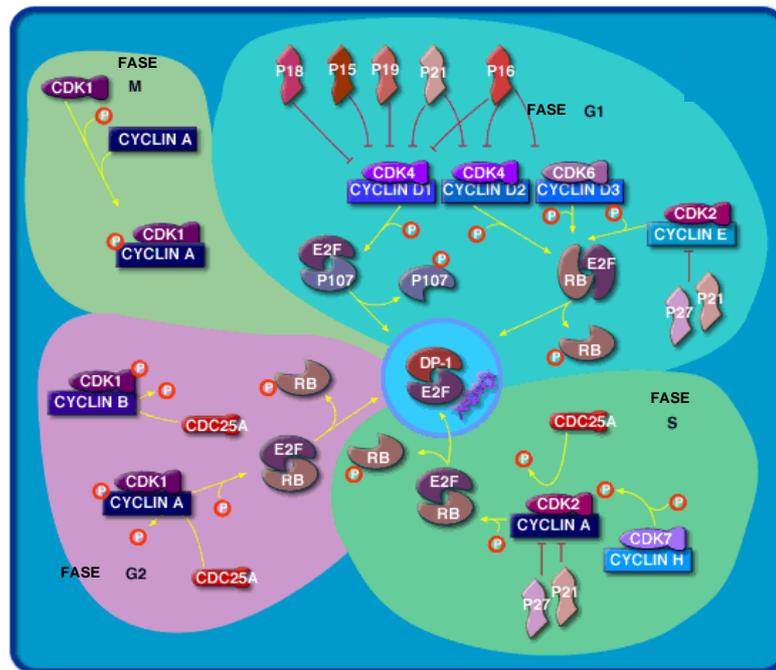


Figura 5: Fases del ciclo celular y moléculas implicadas en la regulación. Figura adaptada de BD Biosciences (www.bd.com)

El retinoblastoma (Rb) es un gen supresor de tumores que inhibe la proliferación celular. La proteína Rb se caracteriza por experimentar cambios de fosforilación a lo largo del ciclo. En células normales en reposo, o al principio de G₁, el Rb se encuentra asociado normalmente a factores de transcripción tales como DHFR, ADN poli α , timidina quinasa, además del E2F, inactivando a la familia de los factores de transcripción E2F necesarios para la proliferación celular. El complejo Rb-E2F asegura que la fase S no se inicie, porque genes cuyos productos son esenciales para la fase S y M dependen de la actividad del E2F (Seville y cols, 2005) (**Figura 6**). Así, esta unión hace que disminuya la habilidad de este factor para estimular la transcripción, de manera que si ocurre algún daño en el DNA, la proteína Rb mantiene secuestrado el factor de transcripción y por tanto detenido el ciclo celular en fase G₁, evitando que se replique un DNA incorrecto. Durante la fase G₁, estímulos mitogénicos incrementan la cantidad de ciclina D que combinada con CDK4 y CDK6 fosforilan e inactivan el Rb que liberará a E2F, el cual participa en la transcripción de varios genes requeridos para la fase S y M (Ren y cols, 2002; Murray, 2004; Sherr y cols, 2004).

Muchas células tumorales carecen del gen de Rb, y al momento de transfectarlas con éste, se observa que un exceso puede inhibir la proliferación celular aún en células normales (Polager, 2002; Sherr y cols, 2004).

La proteína del Rb es sustrato de los complejos CDK-ciclina D (D1, 2, 3) y CDK2-ciclina E. La ciclina D1 tiene una estrecha relación con el Rb, de tal manera que la producción excesiva de D1 dispara la entrada temprana de la célula a la fase S. Por lo tanto, en determinado momento D1 puede inactivar la

función de control de la proteína Rb y permitir a la célula el paso a la fase S. La proteína Rb es, por tanto, un camino hacia la inhibición del crecimiento celular y es el sitio por el cual las señales inhibitorias de crecimiento mantienen a la célula en G₁ o G₀ (Ren y cols, 2002; Murray y cols, 2004) (**Figura 6**).

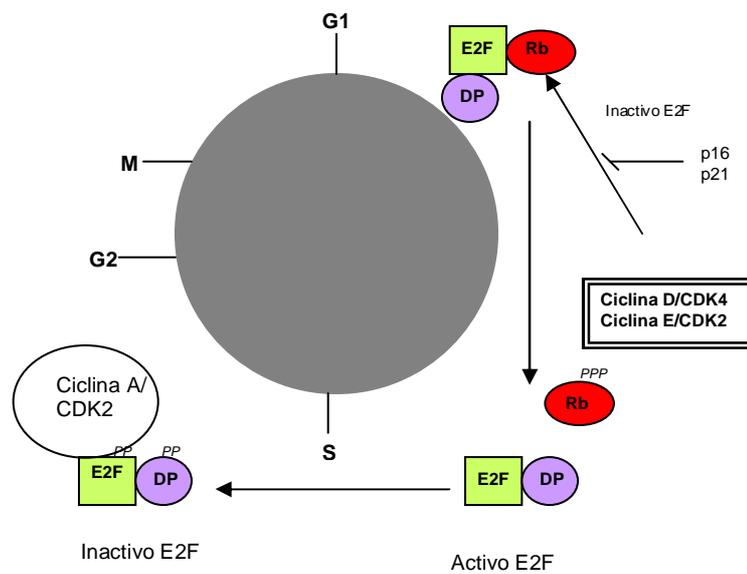


Figura 6: En la fase G₁, la fosforilación del retinoblastoma (Rb) por Ciclina D/CDK4 y por Ciclina E/CDK2, permite la disociación del Rb y E2F. El E2F libre permite la activación de genes necesarios para entrar en la fase S. En la fase S, E2F es inactivado al fosforilarse por Ciclina A/CDK2, saliendo de esta manera de la fase S

Otro gen con carácter oncosupresor es p53. La proteína p53 es un transregulador transcripcional conocido como “guardián del genoma” con capacidad de inducir apoptosis y actuar como

freno en el punto de control G₁/S, cuando es activada por señales de estrés tales como radiaciones gamma, UV, hipoxia, infecciones por virus o daños en el DNA. La proteína p53 funciona como un regulador negativo del ciclo celular, por lo que alteraciones en el gen que interfieren con su función conducen a la pérdida de esta regulación, lo que produce una rápida proliferación celular. La elevación de los niveles de p53 induce a que las células se detengan al final de la fase G₁ y se reparen los daños en el DNA antes de continuar con su replicación en fase S (Lowe y cols, 1993; Gómez-Lázaro y cols, 2004).

En relación a los dos puntos de control en la progresión del ciclo celular, en el primero al final de la fase G₁ y la entrada a la fase S del ciclo celular, p53 tiene una función central, ya que aumenta los niveles de los complejos CDK-ciclina que a su vez modulan la expresión de genes que participan en la proliferación celular. Además, hay evidencias que demuestran que p53 interactúa con los complejos CDK-ciclina. De esta manera, p53 puede reprimir la expresión de genes que participan en los procesos de replicación y transcripción del DNA, como es el caso del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), B-myb, la ADN polimerasa α , C-fos, C-jun, MDM2; o bien, activa genes reguladores negativos de la proliferación celular como Rb, WAF1/CIP1/SD11, GADD45 y GADA produciendo interrupción del ciclo o muerte por apoptosis (Smardova y cols, 2005).

En numerosos carcinomas han sido reportadas alteraciones de p53 en el DNA tumoral, entre los más comunes están los carcinomas de hígado, mama, colon y pulmón, así como el osteosarcoma. La introducción de p53 en las células con mutación del gen, mediante procedimientos de terapia génica, es una posibilidad que está siendo analizada. Por el momento, los estudios se limitan a tumores con crecimiento locorregional, sin

que los estudios fase I y II hayan mostrado una mayor relevancia (Gómez-Lázaro y cols, 2004).

2.1.- Control del ciclo celular y cáncer

El cáncer es la consecuencia de alteraciones en los procesos de señalización que en definitiva generan el control del crecimiento celular. En este aspecto es de suma importancia el ciclo celular, proceso que permite finalmente a la célula dividirse y donde intervienen decisivamente tanto señales de actividad positiva, como son las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), y sus subunidades reguladoras, las ciclinas, como proteínas inhibidoras de las anteriores. Desde el conocimiento del papel de las ciclinas dependientes de quinasas (CDKs) en la regulación del ciclo celular estas han sido empleadas como dianas farmacológicas (Schwartz y cols, 2005; Shapiro, 2006). Existen potentes inhibidores de CDK que serían útiles en tumores con lesiones moleculares de la maquinaria del ciclo celular, como melanomas con mutaciones CDK, linfomas con translocaciones que incrementan ciclina D1 y tumores con pérdida de función en p16 o p21 (Sawyer, 2003).

Existe una estrecha asociación entre el proceso de activación celular y los puntos de control del ciclo celular. La dinámica del ciclo celular está regulada por estos puntos de control que actúan en la transcripción de genes CDK y de las ciclinas, en las modificaciones postranscripcionales de estas proteínas o en la degradación de las mismas. Se conocen dos estadios donde operan los puntos de control en el ciclo celular: uno al final de la fase G_1 y la entrada a la fase S, y el otro, en la transición de la fase G_2 a la fase M. Los procesos de regulación por retroalimentación positiva y negativa también contribuyen a la

progresión del ciclo celular, es decir, la regulación normal del ciclo depende del balance entre los estímulos positivos que lo impulsan y los negativos o frenos que detienen el ciclo. Los controles negativos en dicha progresión están presentes durante el desarrollo, diferenciación, senescencia y muerte celular, y pueden tener una función importante en la prevención de la tumorigénesis (Carson, 2003; Lowe y cols, 2004). De manera general, en la mayoría de los casos, la interrupción de la proliferación celular ocurre cuando la integridad del genoma ha sido comprometida. Alteraciones en el proceso de interrupción del ciclo celular permiten que células con genomas inestables evolucionen a células cancerosas.

Las mutaciones, presentes en las células cancerosas, que provocan la aparición de las características tumorales, afectan a genes cuyos productos proteicos regulan la proliferación celular, la apoptosis o la senescencia celular (**Tabla 3**). A continuación, se definen dos tipos de genes cuya alteración se relaciona con el proceso canceroso: oncogenes y genes supresores de tumores.

<i>Categoría</i>	<i>Gen</i>	<i>Función</i>	<i>Alteración</i>
I	<i>c-ras, c-myc, c-abl, c-Src, c-fos, c-jun, c-ets</i>	Factores de transcripción y transducción	Aumento de su función
II	<i>p53, Rb, APC1, MPC1, p16, p21, p27, Wi</i>	Puntos de control del ciclo celular. Crecimiento y proliferación	Degradación o pérdida de la función
III	A) <i>bcl-2, bax</i> B) <i>p53, c-myc</i> , factores solubles como TNF y FAS	Inhiben apoptosis Inducen apoptosis	Expresión ganancia de la función Degradación o pérdida de la función

Tabla 3: Categorías de genes celulares involucrados en el ciclo celular y en el desarrollo de cáncer

2.1.1.- Mutación de protooncogenes: oncogenes

Se denomina oncogén a la forma mutada de un gen normal o protooncogén, el cual codifica una proteína normal, generalmente relacionada con la proliferación celular o la apoptosis, que actúa sólo cuando recibe señales reguladoras específicas (Munnes y cols, 1998). Por el contrario, la forma mutada u oncogén expresa una proteína anormal que se mantiene activa independientemente de las señales reguladoras, por lo que el resultado es una ganancia de función. Esto conduce, según los casos, a una proliferación descontrolada o a una apoptosis reprimida y, en definitiva, a la aparición del cáncer. Se han identificado protooncogenes que codifican proteínas muy diversas:

- Factores estimuladores del crecimiento celular

Ejemplo: el protooncogén *c-sis* codifica la cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). El oncogén *c-sis* se encuentra asociado a la leucemia crónica mielocítica.

- Receptores de factores de crecimiento o de hormonas (Baselga, 2001)

En la transformación cancerosa, los receptores de los factores de crecimiento de tipo epidérmico juegan un papel de gran relevancia: ErbB-1 o Her1 (EGFR, propiamente dicho), ErbB-2 (Her2-neu), ErbB-3 (Her3) y ErbB-4(Her4). El EGFR se encuentra sobreexpresado en el cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCL), cáncer de próstata, cáncer gástrico, en mama, en colon, en páncreas y en cáncer de ovario. La señalización intracelular mediada por los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) implica la participación en cascada de numerosos genes, bien vía RAS y por tanto las MAP quinasas, o a través de PI3-K y AKT. De esta manera, se transmite la señal al núcleo donde se produce la transcripción de genes y la progresión en el ciclo celular. En las células cancerosas los EGFR pueden estar mutados y por tanto activados constitutivamente. Así, la señal es permanente y se induce proliferación, resistencia a quimioterapia y radioterapia, fenómenos anti-apoptóticos, angiogénesis, fenómenos de invasión y metástasis. Las posibilidades terapéuticas orientadas a bloquear la señal vía EGFR se puede realizar con anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasas y oligonucleótidos antisentido (Normando y cols, 2006).

- Proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales. Ejemplo: protooncogén *ras*. Los genes *ras* (H,K,N) están mutados en nada menos que el 30% de los tumores humanos y actúan como puntos clave en la transmisión de señalización intracelular como verdaderos interruptores. Así se

pasa de una forma inactiva (off) en el que tiene un GDP fijado a otra activa (on) que tiene GTP. El proceso de activación está regulado por los factores GEFs (GDP/GTP exchange factors) y el de inactivación por los GAP (GTPase activating protein) (Gibbs, 2000).

- Factores de transcripción que controlan la expresión de genes que codifican a su vez proteínas implicadas en la señalización, el control del ciclo celular o la apoptosis (p.e: fos, fun y myc) (Gibas, 2000).

- Proteínas responsables de la activación directa del ciclo celular o de la inhibición de la apoptosis, expresando los oncogenes respectivos proteínas en mayor cantidad o con función aumentada. Ejemplos: el protooncogen bcl-1 que codifica la ciclina D1. La translocación de la ciclina D1 aparece en el 43% de tumores de cabeza y cuello, 34% de esófago y 13% de mama. El protooncogén CDK1 que codifica la quinasa dependiente de ciclina CDK1; el protooncogén mdm-2 que codifica un antagonista de la proteína p53; el protooncogén bcl-2 que codifica una proteína mitocondrial que puede proteger la célula contra la apoptosis inducida por daño en el DNA al inhibir las caspasas; mientras que el producto de c-myc (oncogen) puede aumentar la respuesta apoptótica bajo estímulos como el de privación del factor de crecimiento (Hertz y cols, 1999; Remus y cols, 2005) **(Tabla 3)**.

2.1.2.- Mutación de genes supresores de tumores

La célula cuenta con moléculas importantes que vigilan la secuencia normal de acontecimientos genéticos que permiten su proliferación. Estos son los genes supresores de tumores. Cuando los productos de los mismos no son funcionales o están ausentes, la célula pierde la protección que le brinda normalmente lo cual

conduce a la aparición y desarrollo del cáncer (**Tabla 4**). De todos los genes supresores de tumores los más conocidos y estudiados son el retinoblastoma (Rb) y el gen p53 por su estrecha relación con cánceres humanos.

La forma normal del gen supresor codifica una proteína normal antioncogénica, que actúa deteniendo la proliferación o bien induciendo la apoptosis. La mutación de genes supresores de tumores conduce a la síntesis de una proteína no funcional o impide esa síntesis, la proliferación deja de estar controlada o la apoptosis nunca tiene lugar, por lo que aparece una proliferación excesiva, a menudo con acumulación de daños genéticos en las células. Al igual que los protooncogenes, los genes supresores codifican proteínas que actúan en distintos puntos de las rutas de señalización de control y de la apoptosis:

- factores inhibidores del crecimiento celular, receptores de factores inhibidores o de hormonas que frenan el crecimiento celular
- proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales
- proteínas que frenan el ciclo celular o producen apoptosis
- factores de transcripción que dirigen la expresión de genes cuyos productos proteicos frenan el ciclo celular o producen apoptosis (Palka-Santini y cols, 2003; Naumann y cols, 2004).

En la **tabla 4** se exponen alteraciones de genes supresores de tumores y los tumores asociados.

Las mutaciones en el gen p53 son las alteraciones genéticas más comunes en el cáncer humano y son frecuentes en cánceres de colon, mama y pulmón (Sherr y cols, 2002).

Localización subcelular	Gen	Función	Tumores asociados con mutaciones somáticas	Tumores asociados con mutaciones hereditarias
Superficie celular	Receptor de TGF- β	Inhibición del crecimiento	Carcinoma de colon	Desconocidos
	Cadherina E	Adherencia celular	Carcinomas de estómago y mama	Cáncer gástrico familiar
Bajo la membrana citoplasmática	NF-1	Inhibición de la trasducción de la señal ras	Schwannoma y meningiomas	Neurofibromatosis tipo 1 y sarcomas
Citoesqueleto	NF-2	Desconocida	Carcinomas de estómago, colon, páncreas; melanoma	Neurofibromatosis tipo 2; meningiomas y schwannomas del acústico
Citosol	APC	Inhibición de la trasducción de la señal	Retinoblastoma osteosarcoma carcinoma de mama, colon, pulmón	Poliposis adenomatosa familiar, cáncer de colon
Núcleo	Rb	Regulación del ciclo celular	Casi todos los cánceres humanos	Retinoblastoma, osteosarcoma
	P53	Regulación del ciclo celular y apoptosis en respuesta a la lesión de DNA	Tumor de Wilms	Síndrome de Li-Fraumeni; numerosos carcinomas y sarcomas
	WT-1	Trascripción nuclear	Cáncer de páncreas, estómago	Tumor de Wilms
	p16 (INK4a)	Regulación del ciclo celular por inhibición de las cinasas dependientes de las ciclinas		Melanoma maligno
	BRCA-1	Reparación del DNA		Carcinomas de la mama y de ovario
	BRCA-2	Reparación del DNA		Carcinomas de mama

Tabla 4: Alteraciones de genes supresores de tumores y tumores asociados

3.- Apoptosis

En todo organismo multicelular adulto debe existir un equilibrio entre la generación o proliferación y la desaparición o muerte de las células que lo componen, con el fin de mantener un equilibrio y un tamaño constante. La alteración de este equilibrio conduce a situaciones patológicas como el cáncer, cuando la proliferación se encuentra aumentada, o a enfermedades degenerativas, cuando los procesos de muerte celular están incrementados (Evan y cols, 2001; Danial y cols, 2003).

La muerte celular puede ocurrir por dos vías diferentes: necrosis y apoptosis. La necrosis, también conocida como muerte celular patológica, es un proceso que ocurre cuando la agresión excede a la capacidad de la célula para regenerarse y va acompañada de una serie de alteraciones morfológicas y metabólicas que la caracterizan. Esta muerte celular "accidental" ocurre como respuesta a una gran variedad de condiciones extremas o agentes que producen un daño en la membrana plasmática (complemento, virus,...). En cambio, la apoptosis celular es un modo de muerte celular que ocurre bajo condiciones fisiológicas y en la cual la célula participa de forma activa. La apoptosis se controla mediante proteínas implicadas en varios niveles de señalización celular, codificada por protooncogenes y genes supresores de tumores. Al igual que el ciclo celular, el control de la apoptosis puede alterarse generando situaciones patológicas entre las que se incluyen el cáncer (Danial y cols, 2004).

En un amplio grupo de tumores (tanto tumores sólidos como hematológicos) se ha mostrado que las células cancerosas responden de forma anómala a la inducción de apoptosis. Entre

las familias de genes que median la destrucción controlada de la célula, destacan los conocidos como genes de respuesta inmediata, al que pertenecen proteínas como c-jun y c-fos. Otros genes que participan activamente en los procesos apoptóticos son p53, c-myc y la familia de Bcl-2 (Eischen y cols, 2001; Fridman y cols, 2003; Matsumura y cols, 2003). El gran número y diversidad de genes envueltos en la muerte celular muestra la complejidad de los procesos de apoptosis en el ámbito genético.

La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G₁ para impedir que una célula dañada ingrese en la fase de síntesis, de manera que, las mutaciones no se produzcan durante la replicación del DNA; y en la fase G₂ para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis. Una vez que la célula entra en el proceso de apoptosis, en su interior se produce una serie de procesos bioquímicos que conducen a la degradación de proteínas y de la cromatina (Danial, 2004).

La proteólisis, a diferencia de la mayoría de las modificaciones postranslacionales, es irreversible y quizás por ello es altamente específica. Entre las proteasas implicadas en los procesos de muerte celular se encuentran las caspasas, las calpaínas, la granzima B y el complejo multiproteico denominado proteosoma. Las caspasas son una familia de cisteína-proteasas, que se engloban en tres grupos: caspasas implicadas en la producción de citocinas (caspasas 1, 4, 5 y 13), caspasas de señalización o de activación de otras caspasas (caspasas 2, 8, 9 y 10) y caspasas efectoras de muerte o ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7). Numerosas evidencias han mostrado que la inhibición de las caspasas reduce la apoptosis celular inducida por diferentes estímulos. La activación de las caspasas puede tener lugar en respuesta a estímulos tanto extracelulares como intracelulares (). Entre sus sustratos se encuentran: elementos del citoesqueleto

(actina, proteína Tau y cateninas), enzimas encargadas de reparar (PARP) o degradar el DNA celular, factores de transcripción (retinoblastoma, HDM2), proteínas reguladoras (proteína cinasa C, fosfatasas 2A, cinasas de adhesión focal), así como miembros de la familia del oncogén Bcl-2 (Bid) (Eischen y cols, 2001). El control positivo consiste en el inicio de la cascada de caspasas. Una de las principales señales inductoras es la liberación al citoplasma del citocromo c que se une a la proteína Apaf (factor activador de las proteasas apoptóticas) formando un complejo que activa la procaspasa iniciadora.

Algunas proteínas, como Bax, estimulan estas etapas de inicio. Este control positivo de la apoptosis es análogo al ejercido en la proliferación celular por la inducción en cascada de la actividad proteína quinasa de los complejos CDK-ciclina () (**Figura 7**).

El resultado neto de estas interacciones es una parada en fase G₁, la cual provee de una barrera cinética en la replicación de un genoma potencialmente dañado. Si la célula no puede reparar el daño genético, p53 induce la muerte celular por un mecanismo que todavía no es del todo conocido (Fridman y cols, 2003).

El control negativo de la apoptosis, viene determinado por proteínas como Bcl-2 y Bcl-x, que aseguran que el proceso apoptótico permanezca bloqueado bajo condiciones normales. En algunos cánceres se sobreexpresa Bcl-2, reduciendo aún más la apoptosis; en otros, se sobreexpresan proteínas que bloquean las caspasa, como las denominadas survivinas.

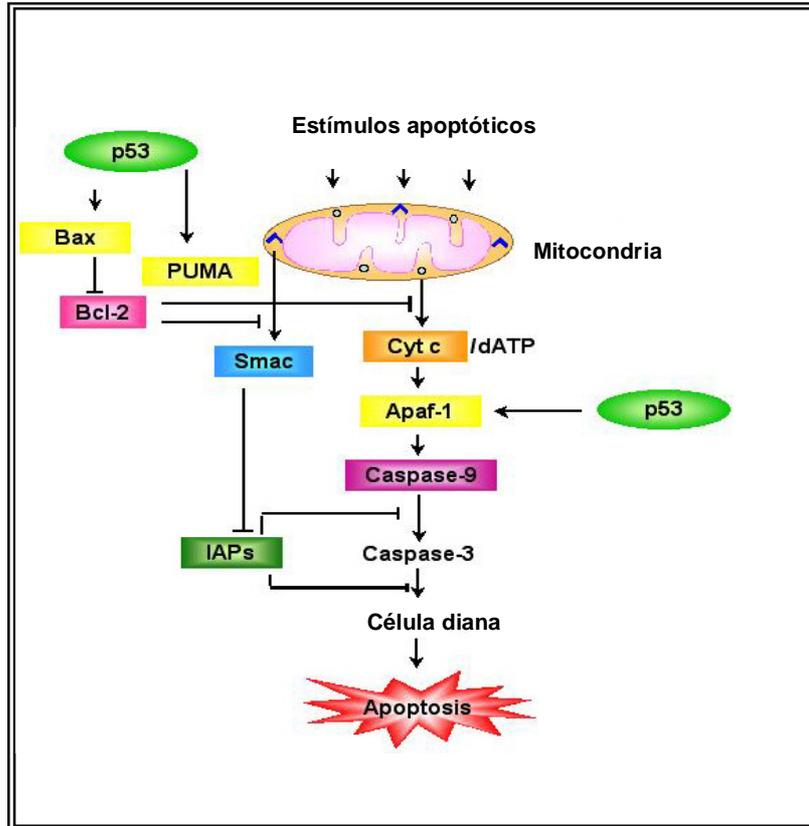


Figura 7: Esquema de representación de ruta de apoptosis dependiente de p-53 por activación de Bax, PUMA y APAF-1

Bcl-2 da nombre a una familia de oncogenes entre los que se encuentran miembros que favorecen la supervivencia celular (Bcl-X y Bcl-2) mientras que otros (Bid, Bad, Bax) ayudan al suicidio celular. Estas proteínas antagonistas forman dímeros unas con otras, siendo su abundancia relativa la que determina el umbral de desencadenamiento de la muerte celular (Huang Z, 2000). La expresión de bcl-2 se considera un factor de peor pronóstico para cánceres de colon, próstata o el neuroblastoma.

Por último, el protooncogén c-myc desempeña un papel decisivo tanto en procesos de proliferación celular como de apoptosis. Así, se ha descrito que mientras su supresión conduce a la parada de la proliferación celular, su sobreexpresión es un estímulo apoptótico (Prendergast, 1999).

4.- Tratamientos del cáncer

La medicina contemporánea ofrece todo un abánico de opciones terapéuticas para los distintos tipos de cáncer, siendo la cirugía temprana el método con mayor tasa de curaciones. Además, la combinación de cirugía mínimamente cruenta y tratamientos coadyuvantes como radioterapia o quimioterapia facilitan y mejoran el pronóstico tras la intervención quirúrgica del paciente. Por otra parte, la radioterapia constituye una buena opción terapéutica en el caso de que la extirpación quirúrgica del tumor no sea recomendable por destruir órganos vitales. Más de la mitad de todos los pacientes con cáncer se someten a radioterapia sola o con tratamiento concomitante (Barcellos-Hoff y cols, 2005).

Una tercera opción es la quimioterapia, un tratamiento sistémico en el que se distribuyen sustancias citotóxicas por todo el organismo. Es especialmente útil si el tumor ya ha progresado hacia metástasis, o bien en el caso de leucemias. A parte del tratamiento con agentes quimioterapéuticos convencionales, algunos tipos de cáncer también responden al tratamiento hormonal, sobre todo el cáncer de mama, útero y próstata. Los efectos adversos de este tipo de tratamiento son menores que los derivados de la quimioterapia (Gelmon y cols, 1999; Gibbs, 2000).

Hace algunos años se albergaron grandes esperanzas en la terapia génica, puesto que el inicio del cáncer siempre va

precedido de un cambio en el genotipo que provoca que una célula antes "normal" se convierta en una célula cancerosa con una proliferación excesiva. Se postuló la teoría de que si el gen dañado y mutado pudiera ser identificado y sustituido por un gen normal y "sano", en principio sería posible combatir el cáncer. Sin embargo, hasta la fecha, muy pocos tipos de cáncer se han atribuido a defectos en genes concretos. A menudo intervienen varios genes, muchos de los cuales ni siquiera se conocen.

El conocimiento del mecanismo de señalización intracelular, desde la activación de receptores hasta la fase ejecutora, está permitiendo establecer nuevas dianas farmacológicas que interfieren con moléculas dianas específicas que tienen un papel en el crecimiento tumoral (Sawyer, 2004; Schwartz y cols, 2005; Ghobrial y cols, 2005).

4.1.- Tratamientos tradicionales

4.1.1.- Radioterapia

Es un tratamiento basado en el empleo de radiaciones ionizantes sobre el tumor, destruyendo las células tumorales e impidiendo así su crecimiento. Esta acción también puede ejercerse sobre los tejidos normales, sin embargo, los tejidos tumorales son más sensibles a la radiación y no pueden reparar el daño producido de forma tan eficiente como lo hace el tejido normal, de manera que son destruidos bloqueando el ciclo celular (Barcellos-Hoff y cols, 2005). Según la forma de aplicación podemos distinguir dos tipos: una radioterapia interna o braquiterapia, insertando material radiactivo (iridio, cesio, yodo...) cerca o dentro del mismo tumor; o una radioterapia externa o

teleterapia, empleando aceleradores de electrones y bomba de cobalto que dirigen la energía radiactiva hacia la zona afectada. La acción biológica de la radioterapia se basa en que las radiaciones ionizantes presentan la capacidad de producir radicales libres al interaccionar con la materia y ceder la energía que vehiculizan, produciendo roturas de enlaces en moléculas biológicas, siendo la más sensible el DNA. Se indica sobre todo para los casos de tumores de cabeza y cuello y cáncer de próstata. También se emplea para tumores ginecológicos, de partes blandas y tumores del sistema nervioso central (Schmaljohann y cols, 2005).

Según sus indicaciones la radioterapia puede ser:

- radical: cuando se utiliza en neoplasias de radiosensibilidad alta y puede asociarse a quimioterapia previa o simultánea
- complementaria: pre o postoperatoria para disminuir el riesgo de recidiva local o regional
- paliativa: para disminuir los síntomas de cánceres localmente avanzados e irresecables o de sus metástasis, consiguiéndose efectos antiálgicos, descompresivos o hemostáticos

La radioterapia puede producir efectos adversos que pueden clasificarse en precoces y tardíos (Turriziani y cols, 2005):

- a) Las reacciones adversas precoces, aparecen durante o inmediatamente después del tratamiento, y suelen ser autolimitadas en el tiempo, aunque pueden durar semanas. Las más frecuentes son reacciones cutáneas (eritema, descamación, depilación), alteraciones gastrointestinales (anorexia, náuseas, esofagitis, diarrea), mucositis, xerostomía y mielosupresión. El tratamiento de estas reacciones es casi siempre sintomático.
- b) Las reacciones adversas tardías, aparecen meses o años después de completar el tratamiento. Son infrecuentes pero graves, progresivas y no suelen responder al tratamiento. Su aparición no se relaciona con antecedentes de reacciones

precoces. Las más comunes son mielopatías, necrosis ósea, fibrosis pulmonar, pericarditis, miocarditis y úlceras cutáneas.

En los últimos años, la combinación terapéutica entre quimioterapia y radioterapia o quimiorradiación (RQT) representa la estrategia predominante en el tratamiento de muchas localizaciones tumorales, entre las que se encuentran los tumores de cabeza y cuello, los del tracto digestivo, el carcinoma pulmonar, cuello uterino y otros muchos. La utilización de la combinación entre radioterapia (RT) y quimioterapia (QT) para conseguir mejorar los pobres resultados en los tumores epiteliales localmente avanzados es de una lógica razonable, ya que integra la eficacia de la radioterapia en el control del tumor primario (altas dosis de irradiación) con el potencial de la quimioterapia para erradicar la enfermedad sistémica, pero además, la quimioterapia refuerza la eficacia de la radioterapia en el control local del tumor (Barcellos-Hoff y cols, 2005).

4.1.2.- Quimioterapia

Se puede definir como aquellas sustancias capaces de inhibir o impedir la evolución de la neoplasia, restringiendo la maduración y proliferación de células malignas, actuando sobre fases específicas del ciclo celular y por ello son activas frente a células que se encuentran en proceso de división. Este mecanismo hace que, a su vez, sean por sí mismas carcinógenas, mutágenas y/o teratógenas.

Los diferentes tipos de quimioterapia son:

- Neoadyuvante: se realiza antes de la cirugía de extirpación tumoral.
- Complementaria: su objetivo es eliminar las metástasis subclínicas en el momento del primer tratamiento. Se debe realizar inmediatamente después del tratamiento local de erradicación.
- Alternante: se realiza cuando un cáncer presenta dos o más subpoblaciones celulares con distinta sensibilidad a los citostáticos.
- Local o dirigida: tiene el fin de aumentar la eficacia y disminuir la toxicidad (intraarterial, intrapericárdica, intratecal, intrapleural, intraperitoneal, etc).

No existe un criterio claramente definido para la clasificación de los agentes citostáticos. Tradicionalmente, se han clasificado en función del nivel de actuación dentro del ciclo celular (**tabla 5**). Sin embargo, esta clasificación no es absoluta, ya que algunos agentes actúan por mecanismos múltiples y de otros se desconoce su nivel de actuación. Otra clasificación de los agentes antineoplásicos es aquella que considera su mecanismo de acción y estructura química (Gelmon y cols, 1999; Gibbs, 2000) (**tabla 5**). Podemos destacar los siguientes grupos:

- Agentes alquilantes (cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, clorambucil, busulfano, ciclofosfamida, ifosfamida,...): muestran gran afinidad por el DNA y las proteínas, a los que adicionan sus radicales altamente reactivos. Así producen enlaces entre cadenas de DNA y otras transformaciones, impidiendo su replicación y transcripción a RNA. Su acción tiene lugar en cualquier fase del ciclo celular. Son eficaces en el tratamiento de leucemias crónicas,

linfomas no Hodgkin, mielomas múltiples y ciertos tumores de pulmón, mama y ovario (Urano y cols, 2002; Sedletska y cols, 2005).

- Nitrosureas (carmustina, lomustina,...): actúan de forma similar a los agentes alquilantes, entorpeciendo la actividad de las enzimas encargadas de reparar el DNA. Se emplean generalmente en el tratamiento de tumores cerebrales o de melanomas malignos (Sugarbaker y cols, 2005).

- Antimetabolitos: actúan en la fase de síntesis del ciclo celular porque interfieren en la síntesis de DNA y RNA. La mayoría son análogos estructurales de los metabolitos que normalmente intervienen en los procesos de crecimiento y división, incorporándose a las moléculas de DNA y RNA, transmitiendo falsos mensajes. Otros inhiben enzimas específicas necesarias para la síntesis de compuestos esenciales. Su eficacia, en general, es máxima cuando la proliferación celular es rápida.

Este tipo de fármacos, entre los que se incluyen, 5-fluorouracilo, metotrexato o gemcitabina se administran a enfermos que padecen tumores de mama, ovario o bien del tracto gastrointestinal y también a pacientes que padecen leucemia crónica ().

- Taxanos: paclitaxel, docetaxel. El paclitaxel fue aislado de un árbol, *Taxus brevifolia* (Schiff y cols, 1979; Manfredi y cols, 1984; Oberlie y cols, 2004) y posteriormente surgió el docetaxel (; Bekaii-Saab y cols, 2005), análogo semisintético de paclitaxel. Son fármacos de reciente aparición, y constituyen en la actualidad una de las principales armas terapéuticas en el tratamiento quimioterapéutico del cáncer de ovario, mama, pulmón no microcítico, próstata e incluso inhibe la metástasis de distintos tumores como melanomas (Lee LF y cols, 1998; Wang y cols, 2003). Actúan promoviendo la formación de microtúbulos al unirse

a la β -tubulina formándose estructuras microtubulares anómalas o excesivamente estables que no pueden participar en la mitosis, presentándose un acúmulo de células en la fase G₂-M (Crown y cols, 2000; Abal y cols, 2003). También presentan la capacidad de activar e inducir apoptosis mediada por caspasa 10 (Park S, 2004). A altas concentraciones, paclitaxel estimula la liberación del factor de necrosis tumoral α y de IL-1 en ratón y activa la expresión de IL-8 en células de pulmón y ovario (Lee LF y cols, 1997; Collins y cols, 2000).

- Otros: antraciclinas (epirubicina,...), vincaalcaloides (vincristina, vinorelbina,...), inhibidores de topoisomerasa (topotecan, etopósido,...), antibióticos (doxorrubicina, bleomicina, mitramicina, mitomicina C) (Jacquet y cols, 1996; Sugarbaker y cols, 1996; Van Ruth y cols, 2003).

Clasificación	Principios activos	Mecanismos de acción	Fase principal de actividad en el ciclo celular
Sustancias alquilantes	Ifosfamida Ciclofosfamida Treosulfan Carboplatino Cisplatino Tiotepa Mecloretamina Clorambucilo Busulfan Nitrosureas Dacarbazina	Alquilación del DNA ↓ Enlaces cruzados ↓ Inhibición de la replicación del DNA	Actividad inespecífica en todas las fases del ciclo celular
Antimetabolitos	Citarabina 5-Fluorouracilo Gemcitabina Mercaptopurina Metotrexato Floxuridina Hidroxiurea Hexametilmelamina Amsacrina Procarbazina Irinotecan	Incorporación de una base falsa en el DNA ↓ Inhibición enzimática o codificación errónea en la síntesis del DNA	Fase S
Inhibidores de la mitosis	Paclitaxel Vinorelbina Docetaxel Vincristina Vinblastina Vindesina	Alteración de la formación de microtúbulos ↓ Detención de la mitosis en metafase	Fase M
Antibióticos con efecto citostático	Daunorubicina Doxorubicina Epirubicina Mitoxantrona Dactinomicina Mitomicina C	Intercalación entre bases del DNA ↓ Inhibición de la biosíntesis del DNA	Fase S Fase G ₂
Inhibidor de la Topoisomerasa I	Etopósido Tenipósido	Inhibición de la Topoisomerasa I: inhibe la torsión del DNA	Fase S Fase G ₂ Fase M
Inhibidor de la Topoisomerasa II	Topotecan	Inhibición de la topoisomerasa II que cataliza la torsión del DNA, también procesos opuestos	Fase S
L-Asparaginasa	L-Asparaginasa	Inhibición de la síntesis de proteínas y de la síntesis de DNA y RNA	Fase G ₁

Tabla 5: Clasificación de los agentes citostáticos en función de su mecanismo de acción

Nuevos fármacos en fase de experimentación: ixabepilone, patupilone o eptilone evaden los mecanismos de multiresistencia ocasionada por algunos citostáticos (Lee y cols, 2005). También se han diseñado nuevos fármacos que actúan sobre el ciclo celular, y se han dividido en dos grandes grupos:

- Moduladores directos que inhiben la función catalítica de las CDK adecuadamente activadas (Sawyers, 2003). Entre los moduladores directos se incluyen:

- Purinas y análogos de las purinas (6 dimetilaminopurina, isopenteniladenina, olomucina y roscoviotina)

- Productos sintéticos naturales (butirolactona, flavopiridol, saturospina, UCN-10, 9 hidrox-elipticina, toyocamicina y suramina)

- Productos miméticos (p16, p21)

- Moduladores indirectos que alteran el estado activado de las CDK. A su vez entre los moduladores indirectos cabe destacar los siguientes:

- Los que actúan reduciendo los niveles de ciclina D (rapamicina, ansamicinas benzoquinóides, tirfostinas, inhibidores metabólicos)

- Los que aumentan los inhibidores endógenos de CDK (butiratos, retinoides, y otros agentes diferenciadores)

- Los que alteran los puntos de control (checkpoints): inhibidores de fosfatasas (ácido okadáico), UCN-01 y la misma cafeína. Muchos de ellos se encuentran en fase I y fase II, siendo muy pocos los que están evaluándose en fase III.

Las células cancerosas crecen y se reproducen muy rápidamente, y por ello los agentes que se usan para el tratamiento de quimioterapia, en general, son aquellos que atacan las células de crecimiento rápido, interactuando con su DNA, su

RNA o con la síntesis de proteínas celulares. De igual forma, los agentes que se usan para combatir el cáncer también pueden afectar a las células normales de tejidos de rápida renovación y, en ocasiones, causar efectos secundarios indeseables. Dentro de estos efectos secundarios destacan: fatiga, náuseas y vómitos, pérdida del cabello, dolor, pancitopenia, infecciones, problemas de coagulación, etc. Las acciones tóxicas de éstos medicamentos incluyen: teratógena, citostática, carcinógena, mutágena, alteración corneal, cardiopélica, hepatopélica, nefropélica, hemorrágica, vesicante, irritante de piel y mucosas, emetizante, hematopélica (Gelmon y cols, 1999; Gibbs, 2000). Esto no quiere decir que todos produzcan estas reacciones, sino que unos producen unas y otros producen otras, pudiendo algunos tener varios de los efectos mencionados. Estos efectos secundarios o tóxicos pueden variar mucho de un paciente a otro (Gelmon y cols, 1999; Gibbs, 2000).

4.2.- Inmunoterapia

Paul Ehrlich fue uno de los primeros en introducir el concepto de inmunovigilancia al plantear la idea de que el sistema inmune podría ejercer un efecto represor sobre los carcinomas (Ehrlich, 1909). Esta teoría se afianza posteriormente con los ensayos de los trasplantes de tumores en ratones y la descripción de los antígenos tumorales (Klein, 1966). Posteriormente los antígenos tumorales reconocidos por células T fueron descritos en humanos (Van der Bruggen y cols, 1991; Boon y cols, 1994). La lista de antígenos tumorales reconocidos por las células T que se han identificado está creciendo continuamente. Basándonos en el patrón de expresión de la proteína parental, los

antígenos tumorales pueden ser clasificados en seis grupos principales:

1. Antígenos compartidos por distintos tumores y expresados en testículo, cáncer testis (CTA)
2. Antígenos de diferenciación
3. Antígenos generados por mutaciones
4. Mucinas
5. Antígenos sobreexpresados en tumores
6. Antígenos virales

La inmunovigilancia juega un papel importante en la supresión del crecimiento tumoral en las etapas más tempranas. Por tanto, se piensa que cuando el tumor crece ha “escapado” de esta inmunovigilancia. Esto indica que las células tumorales deben desarrollar mecanismos de escape frente al sistema inmune que les permita escapar a su control (Garrido y cols 1993; de Vries y cols, 1997). A continuación, se detallan los mecanismos de escape más representativos:

- Pérdida o baja expresión de las moléculas MHC de clase I

La pérdida de las moléculas de clase I es un mecanismo desarrollado frecuentemente por las células tumorales, tanto en tumores experimentales como espontáneos, para escapar del reconocimiento y destrucción por los CTLs. Estudios realizados en los últimos años por diferentes grupos muestran que este es uno de los mecanismos más importantes (Garrido y cols, 1993, 1997 y 2001; Hicklin y cols, 1999).

La pérdida del antígeno del MHC asociado a la molécula de clase I H-2K^k fue descrita por primera vez en un linfoma murino en 1976 y en 1977 se detectaron pérdidas de moléculas HLA en

tumores humanos (Garrido y cols, 1976; Pellegrino y cols, 1977). A partir de aquí son innumerables los tumores murinos y humanos donde se han encontrado fenotipos MHC de clase I alterados (Garrido y cols, 1997; García-Lora y cols, 2003; Algarra y cols, 2004).

- *Pérdida de antígenos tumorales e inmunodominancia* (de Vries y cols, 1997; Schreiber y cols, 2002)
- *Señalización defectiva a través de receptores de muerte* (Davidson y cols, 1998; Straus y cols, 2001; Takeda y cols, 2001)
- *Ausencia de coestimulación* (Schwartz, 1990)
- *Citoquinas inmunosupresoras* (Toi y cols, 1996; Huang y cols, 1998; Almand y cols, 2000)
- *Apoptosis de las células T activadas* (Chappel y cols, 1999; Zaks y cols, 1999)
- *Degradación enzimática del triptófano* (Uyttenhove y cols, 2003)

Uno de los mayores problemas que presentan los tratamientos convencionales contra el cáncer (quimioterapia y radioterapia) es el estrecho índice terapéutico entre las células normales y las neoplásicas, que comparten el 99% de su dotación genética y de su expresión fenotípica. La inmunoterapia se perfila como el cuarto pilar en el tratamiento de las neoplasias malignas, después de las formas ya establecidas: cirugía, radioterapia y quimioterapia (Yang JC, 2001).

En Europa, Asia y Estados Unidos se han aplicado diferentes protocolos de inmunoterapia celular antitumoral en pacientes con cáncer avanzado recidivante a los tratamientos convencionales, y han provocado globalmente respuestas antitumorales completas en un 5-10% y parciales en 10-20% de los pacientes (Ockert y cols, 1999; Chattopadhyay, 1999; Rosenberg, 2001). Aunque en la actualidad, los resultados de la

utilización de los métodos inmunológicos en el tratamiento del cáncer han sido discretos, se continúan desarrollando métodos que han mostrado determinada eficacia en modelos animales y también en algunos ensayos clínicos controlados, pero se necesita un mayor esfuerzo en esas investigaciones para obtener protocolos que puedan actuar en la prevención y tratamiento de los tumores malignos de una forma bien establecida (Ben-Efrain, 1999).

La inmunoterapia se puede aplicar de forma activa o pasiva, específica o inespecífica o incluso combinada (**Tabla 6**).

Activa no específica	BCG (Bacilo Calmette Guerin) Adyuvantes: P40, Polyerga, Titermax, etc. Corynebacterium parvum y granulosum Levamisol Anticuerpos anti-CD3 estimulantes
Activa específica	Vacunas de células tumorales Vacunas de extractos celulares Vacunas de antígenos tumorales purificados o recombinantes Vacunas de células dendríticas
Pasiva no específica	Células asesinas activadas por linfocinas Citocinas: IL-2, TNF, IFN α , IFN γ , factores de crecimiento hematopoyéticos
Pasiva específica	Linfocitos infiltrantes de tumores Inmunotoxinas Anticuerpos antiidiotípicos Anticuerpos bioespecíficos (De Libero y cols, 2001; Livingston, 2001; Buteau y cols, 2002).
Otras modalidades	Depleción de médula ósea y luego trasplante autólogo Anticuerpos bloqueadores de receptores de Factores de Crecimiento en las células tumorales (Ballen y cols, 1997) Protectores medulares para la aplicación de altas dosis de quimioterapia (González y cols, 2001) Bioterapia con productos naturales (Hankins y cols, 2002)

Tabla 6: Estrategias de inmunoterapia

5.- AGENTES ANTITUMORALES DERIVADOS DE PLANTAS: FITOQUÍMICOS ANTITUMORALES

Debido a la alta toxicidad y a la multiresistencia de las drogas citostáticas utilizadas actualmente, además de los programas de desarrollo de fármacos estándares, cada vez se da más énfasis al desarrollo de nuevos agentes naturales antitumorales derivados de plantas. En la actualidad, existen evidencias clínicas de las propiedades inmunomoduladoras y antitumorales de un gran número de productos obtenidos de plantas que presentan menor toxicidad que los actuales tratamientos empleados (Sawyers, 2004; Shukla, 2004; Takaray y cols, 2005; Shinya y cols, 2005).

5.1.- Citotóxicos

Existen numerosos extractos derivados de plantas con acción citostática, dentro de este grupo podemos destacar el extracto de *Magnolia officinalis* utilizado en la medicina tradicional china, con una gran variedad de efectos además del antitumoral: antiinflamatorio, antitrombótico, antioxidantes y efectos ansiolíticos (Liou y cols, 2003). Se han realizado estudios mostrando una acción citotóxica *in vivo* en ratones atímicos Balb/c, sobre el crecimiento de tumores derivados de distintas líneas celulares humanas: células leucémicas humanas (Hirano y cols, 1994), fibrosarcoma (Nagase y cols, 2001), adenocarcinoma de pulmón (Yang SE y cols, 2002), angiosarcoma (Bai y cols, 2003) y carcinoma de colon (Chen y cols, 2004). Con este extracto se han realizado recientemente ensayos de proliferación celular *in vitro* con la línea tumoral humana derivada de un carcinoma colorrectal

RKO, encontrándose una importante inhibición del crecimiento de las células tumorales (DI 50: 12.47 $\mu\text{g/ml}$) con una parada del ciclo celular de las mismas en la fase G_1 y una inducción de apoptosis por activación de la cascada de caspasas (Liou y cols, 2003). Además, se han realizado ensayos *in vivo* con este extracto valorando la ascitis surgida tras transplantar las línea RKO vía intraperitoneal y administrando 2 mg del extracto por ratón. Al cabo de 12 días se observa que el 80% de animales tratados no presenta ascitis (Chen y cols, 2004). Cuando *Magnolia* (80 mg/Kg/d) fue administrada intraperitonealmente a ratones atímicos tras inyectar células RKO en la axila, se observaron diferencias significativas en el tamaño tumoral y un aumento de la supervivencia en los ratones tratados en relación a los controles (Liou y cols, 2003).

Otro producto fitoquímico con propiedades citotóxicas es el derivado PC-SPES, compuesto de ocho plantas (*Scutellaria baicalensis Georgi*, *Rabdosia rubescen*, *Isatis Indigotica Fort*, *Panax notoginseng Burk*, *Ganoderma lucidum Karst*, *Serenoa repens*, *Dendranthema morifolium Tzvel* y *Glycyrrhiza glabra L*) que presenta una actividad antitumoral en modelos animales de cáncer de próstata (Kuboata T y cols, 2000) y una actividad antiproliferativa *in vitro* en distintas líneas celulares tumorales de mama, melanoma, leucemias (Taile y cols, 1999; Ibeke y cols, 2001). Otro estudio investiga los efectos *in vitro* del extracto etanólico de PC-SPES sobre distintas líneas tumorales de colon (DLD-1, SW480, SW620) presentando *in vitro* una inhibición de la proliferación de las líneas estudiadas de hasta un 95%, una alteración del ciclo celular con un importante acumulación de las células en la fase G_2 -M (de hasta el 60%) y un aumento de la apoptosis en presencia de este extracto (Huerta y cols, 2002). También se han realizado estudios *in vivo* con este extracto en un

modelo murino de carcinogénesis intestinal. Los ratones fueron tratados con 250 mg/Kg/día del extracto vía gastrointestinal, cinco veces a la semana durante 10 semanas. Después del tratamiento se observó un 58% de reducción en el número de tumores en el grupo tratado respecto al control (Huerta y cols, 2002).

Debido a la resistencia que experimentan las drogas citostáticas, se han realizado ensayos *in vitro* donde se cultivan células tumorales con citostáticos conocidos en combinación con distintos extractos de plantas. En un trabajo reciente se estudia la sensibilidad de distintos extractos de plantas (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer, *Rheum palmatum* Linne, *Zingiber officinale* Roscoe, *Zyzyphus jujuba* Miller, *Coptis japonica* Makino,...) en combinación con citostáticos conocidos como Paclitaxel o 5-Fluorouracilo. En este estudio se muestra un aumento de la acción de los citostáticos en presencia de estas sustancias sobre el carcinoma de cérvix humano, HeLa, pudiendo así ser utilizados en la clínica para intensificar los resultados de la quimioterapia (Takara y cols, 2005).

5.2.- Inmunomoduladores

Numerosos productos o extractos derivados de plantas han sido usados para estimular la respuesta inmune. Un interesante grupo de derivados con potencial mitogénico, lo constituye las lectinas. Las lectinas son proteínas de origen no inmune que tienen en común la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, con capacidad para aglutinar células y precipitar glicoconjugados. Sus propiedades mitogénicas permiten que se utilicen en estudios *in vitro*, como base de la proliferación de linfocitos en cultivos. Actualmente, se han estudiado 9 lectinas con efecto mitogénico sobre los linfocitos,

entre las que se destacan las provenientes de *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Canavalia ensiformis* (Con A), *Pisum sativum* (PSA) y *Fitolaca americana* (PWM). La PHA y Con A inducen mitogenicidad en células T, mientras que el mitógeno de carmín (PWM) estimula ambos tipos de células (Itichi y cols, 1996; Kiss y cols, 1997). No se conoce lectina alguna que estimule sólo a los linfocitos B humanos. Además se han realizado investigaciones para utilizar las lectinas y polímeros sintéticos enlazados a ellas como la Ricina y Abrina como agentes anticancerígenos *in vitro*, ya que se ha visto que disminuyen el crecimiento de células tumorales (Wimer y cols, 1996 y 1997). El gran inconveniente de las lectinas es su alta toxicidad *in vivo*.

Existen numerosos estudios realizados *in vitro* usando derivados de plantas que presentan propiedades mitogénicas sobre PBLs. Dentro de estos, podemos destacar el extracto *Silybum marianum* que induce un aumento de la proliferación de linfocitos murinos *in vitro*, junto con un incremento de interferón gamma, IL-4 e IL-10 en los timocitos (Wilasrusmee y cols, 2002). Se ha evaluado el efecto inmunomodulador *in vitro*, sobre linfocitos de sangre periférica y timocitos, de los extractos etanólicos de cinco plantas: *Silybum marianum*, *Matricaria chamomilla*, *Caléndula officinalis*, *Cichorium intybus* y *Dracocephalum Kotschy* (Amirghofran y cols, 2000). Los resultados obtenidos muestran, que ninguno de los extractos presenta un efecto mitogénico directo, excepto *S. marianum* (100 µg/ml) que muestra un 13% de incremento de la proliferación de linfocitos a una concentración de 50 µg/ml. En cultivos extralinfocitarios se observa un marcado efecto mitogénico con bajas concentraciones de todos los extractos excepto *Dracocephalum*, destacando los linfocitos tratados con 0.1-10 µg/ml de *C. officinalis* y 10 µg/ml de

M.chamomilla y *C. intus* que presentan un fuerte incremento en la proliferación celular (Amirghofran y cols, 2000).

Los polisacáridos obtenidos de la fracción soluble en agua de distintas plantas como *Plantago lanceolata*, *Salvia officinalis*, *Valeriana Officinalis* y *Rudbeckia fulgida* fueron analizados *in vitro* para conocer la actividad mitogénica en timocitos de ratas y ratones, observándose una respuesta mitogénica dosis-dependiente (Ebringerova y cols, 2003).

Tratamientos con extractos acuosos de *Boerhaavia difusa* han mostrado inducir leucocitosis con predominio de neutrofilia, asociada con una estimulación de la fagocitosis y de la capacidad bactericida de neutrófilos y macrófagos (Mungantiwar y cols, 1999). Además se ha observado en ratones, que este extracto protege de la peritonitis inducida por *Escherichia coli*, debido a su actividad inmunomoduladora (Mungantiwar y cols, 1999). La administración vía oral de la fracción alcaloide de esta planta a una concentración de 25-100 mg/kg de peso durante 10 días, induce una actividad mitogénica, en linfocitos T y B. Esta fracción, por el contrario, no ha mostrado un efecto inmunoestimulador *in vitro*, indicando que la fracción puede ser metabolizada a su forma activa *in vivo* o que actúa indirectamente para producir su efecto (Mungantiwar y cols 1999).

Sakurai y cols, han estudiado la fracción de polisacáridos peptídicos de otro extracto natural derivado de *Bupléurum falcatum* (Sakurai y cols, 1999). Este extracto fue administrado vía oral a ratones durante 7 días consecutivos, observándose un incremento de linfocitos CD25 y de la inmunoglobulina IgM en los esplenocitos de los ratones tratados.

Otro gran grupo de fitoquímicos lo constituyen polisacáridos derivados de hongos con propiedades inmunomoduladoras y antitumorales. El producto PSK obtenido del

hongo *Coriolus versicolor* también conocida como Krestin, ha sido utilizado en Asia desde hace más de 30 años. Su actividad antitumoral ha sido documentada *in vitro* en modelos animales y en ensayos clínicos humanos (Kudo y cols 2002), presentando resultados positivos en el tratamiento del cáncer gástrico, de esófago, mama y pulmón. Así se ha observado un aumento de la supervivencia en ratones, una estimulación de la actividad fagocítica de macrófagos y del sistema reticuloendotelial. Se ha mostrado una actividad antitumoral en animales con adenocarcinoma, fibrosarcoma, mastocitoma, plasmocitoma, melanoma, sarcoma, carcinoma de colon, mama y pulmón (Sugimachi y cols, 1997). Por otra parte, la inyección de PSK en el mismo sitio del tumor, induce una inhibición del crecimiento tumoral de tumores en otras localizaciones, previniendo de esta manera la formación de metástasis (Kobayashi y cols, 1995; Stamets, 2000).

El efecto antitumoral se cree que reside en una actividad inmunomoduladora, preferentemente sobre las células NK aunque el mecanismo molecular responsable de su actividad biológica todavía no ha sido totalmente aclarado. Estudios previos de nuestro grupo han mostrado que PSK induce un aumento de proliferación de la línea leucémica NKL, una línea dependiente de IL-2, del mismo modo que lo hace esta interleucina. Se ha comprobado que PSK regula diferentes factores transcripcionales, isoenzimas de la PKC y MAP, utilizando vías de transducción de señales distintas a la IL-2 (García-Lora y cols, 2001y 2003a). Se ha identificado que el receptor utilizado por la PSK (48 Kd) en la línea NKL era distinto al utilizado por la IL-2 (64 y 75 Kd) (Jiménez-Medina y cols, 2005). En este mismo estudio se mostró que PSK está compuesta por una única proteína de unos 12 Kd altamente glicosilada.

Polisacáridos como *Ganoderma lucidum* (Cao y cols, 2004; Sliva y cols, 2002), *Lentinus edodes*, *Schizophyllan*, *Inonotus obliquus* entre otros muchos, han sido utilizados desde hace cientos de años en Korea, China, Japón y este de Rusia sobre todo para el tratamiento de cánceres de estómago, próstata y pulmón (Ooi y Liu, 1999; Wasser, 2002). Así estudios realizados con la administración de *Flammulina velutipes* vía oral durante 10 días en ratones con fibrosarcoma, han mostrado una prevención de metástasis y un aumento de la supervivencia (Ikekawa, 2001). Del mismo modo la administración de lentininas derivadas de *Lentinus edodes* produce un 80% de reducción del tamaño tumoral o una completa regresión (Chihara, 1981). El polisacárido *Schizophylla* muestra una actividad antitumoral contra las formas sólidas y ascíticas del Sarcoma 180, así como contra los tumores sólidos del sarcoma 37, sarcoma de Ehrlich, sarcoma de Yoshida y carcinoma pulmonar de Lewis (Hobbs 1995; Borchers y cols, 1999). Este extracto incrementa la inmunidad celular por activación de las células T e incrementa la citotoxicidad de células NK y LAK (Mizuno, 1996, 1999 y 2002).

En realidad, los mecanismos biológicos que median la actividad biológica de los polisacáridos aún no son del todo conocidos. Los polisacáridos derivados de hongos no atacan directamente las células tumorales, presentando un efecto antitumoral por activación de diferentes respuestas inmunes en el huésped. Esta acción antitumoral requiere un componente intacto de linfocitos, mediándose su actividad por mecanismos inmunológicos dependientes del timo (Borchers y cols, 1999). Esta acción se ha verificado en diversos ensayos, en los que utilizando ratones timectomizados o tras la administración de suero antilinfocitos, se pierde esta acción antitumoral (Ooi y Liu 1999). Estos polisacáridos estimulan las células NK, células B,

células T y macrófagos. Esta acción inmunomoduladora es especialmente valorable en el caso de profilaxis, como forma no invasiva de tratamiento, prevención de metástasis y como adyuvante de la quimioterapia (Wasser y cols, 1999; Ooi 2000; Tzianabos, 2000; ReshetniKov y cols, 2001; Eun Mi y cols, 2004; Ohwada y cols, 2004).

6.- CALÉNDULA

La *Caléndula officinales* (L. Asteraceae) es una planta muy cultivada como especie ornamental y sus flores se utilizan frecuentemente en Europa y Asia occidental en medicina popular. Conocida vulgarmente como “maravilla de los jardines”, la palabra “caléndula” viene del latín *calenda* que designaba el primer día del mes. Los romanos, sin embargo, la llamaban *Solsequium*, que quiere decir “que sigue al sol”, acción que realizan las flores de la Caléndula al igual que los girasoles.

Es una de las especies que el Ministerio de Salud Pública ha incluido entre los medicamentos de origen vegetal cuyo uso ha sido autorizado. La parte más empleada son los capítulos florales o pétalos, que tienen entre los componentes que se han aislado los siguientes (Graeza, 1968; Akihisa y cols, 1996; Qiu Xiao y cols, 2001; Yoshikawa y cols, 2001; Bako y cols, 2002):

- Triterpenos: monoesteres del faradiol
- Saponósidos: calendulósidos (monodesmósidos y bidesmósidos del ácido oleanólico).
- Aceites esenciales: derivados monoterpénicos y sesquiterpénicos oxigenados.
- Flavonoides insaturados: mono y oligosacáridos del quercetol e isorramnetol.

- Polisacáridos: D-galactosa, L-arabinosa, L-fucosa, D-ácido galacturónico, D-xilosa, D-manosa.
- Carotenoides, esteroides, ácidos fenólicos y vitaminas.

Las flores de esta planta se han empleado en Europa y este de Asia y numerosas acciones han sido demostradas: inmunoestimulante (Amirghofran y cols, 2000), antitumoral (Boucad-Maitre, 1988), antiinflamatoria (Akihisa y cols. 1996; Zitterl-Eslsner y cols, 1997; Sarrell y cols, 2001 y 2003), analgésica (Sarrell y cols, 2001 y 2003), antibacteriana (Friedman y cols, 2002), antioxidante (Córdova y cols, 2002), antiviral (Elie y cols, 2004), anti-VIH (Kalvatchev y cols, 1997), diurética, antidismenorreica e incluso presenta propiedades genotóxicas y antigenotóxicas en células de hígado de ratas cultivadas con dietilnitrosamina (Pérez-Carreón y cols, 2002). El extracto de caléndula está incluido en una amplia variedad de cosméticos, así se han realizado estudios de seguridad *in vivo* en ratones y ratas. Se ha evaluado la irritación dérmica y ocular, la fotosensibilidad, concluyendo que *Caléndula officinalis* no es un producto tóxico aunque según este estudio habría que realizar más ensayos (No autores listados, 2001).

Ensayos *in vivo* de un extracto metanólico de la caléndula y de una fracción butanólica han mostrado una acción hipoglucemiante y gastroprotectora (Yoshikawa y cols, 2001). Además la fracción butanólica de la caléndula, rica en flavonoides y terpenoides, presenta una importante actividad antioxidante, que podría explicar las propiedades antiinflamatorias, bactericidas y antisépticas de este extracto (Córdova y cols, 2002).

La actividad antiinflamatoria demostrada junto con su poder cicatrizante y regenerador de epitelios justifica su amplia utilización en diversas alteraciones de la piel y en la cicatrización de heridas quirúrgicas. Relacionada con esta acción, se ha realizado

recientemente un estudio con 245 pacientes operadas de cáncer de mama. Estas pacientes recibieron caléndula o trolamina (un rutinario tratamiento de aplicación tópica durante la radioterapia postintervención) y los resultados mostraron que la presentación de dermatitis aguda grado 2 o más alta fue significativamente más baja en pacientes que usaron caléndula en vez de trolamina (Pommier y cols, 2004). Otros ensayos en los que se estudia su acción antiinflamatoria son los estudios a doble ciego realizados en niños que presentan otalgias asociadas a otitis medias, en los que se ha comparado el tratamiento con gotas de un producto compuesto de extractos de varias plantas (*caléndula officinalis*, *allium sativum*, *verbascum thapsus*, *lavender*, *hypericum perforatum*) con anestésicos en gotas convencionales con o sin amoxicilina. El porcentaje de reducción del dolor en el grupo tratado sólo con el extracto es mayor que los grupos tratados con antibióticos y/o anestésicos (Sarrel y cols, 2001 y 2003).

Friedman ha estudiado la actividad bactericida de aceites esenciales derivados de caléndula contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* observando que el aceite de caléndula presenta una gran actividad contra *C. jejuni* (Friedman y cols, 2002) y una actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochareus* y *fusarium moniliforme*. Incluso el extracto orgánico de las flores secas de la caléndula ha mostrado una potente actividad anti-VIH *in vitro* sobre la transcripción del virus (Kalvatchev y cols, 1997). Un estudio muestra una acción antiedematosa de tripterpenos derivados de la caléndula (Zitterl-Eslseer, 1997).

Las propiedades inmunomoduladoras y antitumorales de la caléndula, relacionadas con el tratamiento del cáncer, han sido poco estudiadas. Tan solo existen dos estudios relacionadas con su actividad inmunomoduladora, donde se muestra un aumento de

la actividad proliferativa de PBLs (índice de estimulación: 1.34-1.80) en presencia de caléndula (Wagner y cols 1985; Amirghofran y cols, 2000). En un único estudio preliminar se analiza su actividad citotóxica *in vitro* de 5 extractos, en tres líneas tumorales (MRC5, Hep2, Ehrlich). Las líneas se cultivan con tres concentraciones de los extractos (100 µg/ml, 500 µg/ml y 1000 µg/ml) midiéndose la viabilidad celular con trypan blue. Los resultados mostraron una inhibición de la proliferación de las células tratadas con caléndula en comparación al control entre 20-100% (Boucad-Maitre, 1988). La acción antitumoral también fue evaluada *in vivo* midiendo la ascitis y la supervivencia a las 2 semanas de inocular el carcinoma murino Ehrlich (10^6 células) y administrando diariamente 25 mg/kg de peso de cada uno de los extractos vía oral o parenteral (intramuscular e intraperitoneal). La actividad antitumoral de la caléndula fue evaluada diariamente por el número de supervivientes y por el peso de los ratones. En otros ensayos se muestra un aumento de la supervivencia en los animales tratados con uno de los extractos y se concluye que el extracto de caléndula es más eficaz por vía oral que por vía parenteral (Boucad-Maitre, 1988).

Objetivos

Los objetivos que nos planteamos fueron los siguientes:

1. Determinación de las condiciones óptimas del proceso de obtención del extracto de caléndula activado por láser, LACE (**L**áser **A**ctivado **C**aléndula **E**xtract)
2. Determinación de su acción *in vitro* sobre la proliferación de linfocitos humanos de sangre periférica
3. Análisis de su efecto *in vitro* en la proliferación de líneas celulares tumorales derivadas de diferentes tumores sólidos y de leucemias
4. Si alguna actividad es encontrada *in vitro*, determinación de los mecanismos moleculares implicados
5. Estudio de su toxicidad *in vivo* en ratones y ratas
6. Detección de actividad inmunomoduladora *in vivo* sobre linfocitos en ratones
7. Estudio de su actividad antitumoral en modelos tumorales murinos

Material y métodos

1.- Material y soluciones de uso general

1.1.- Material

Agitador magnético (SBS)
Autoclave (Selecta, Autotester)
Balanza (Denver)
Balanza de precisión (Gibertini)
Baño (Bunsen)
Bomba de vacío
Cámara de flujo laminar (Flow Lab)
Cámara de recuento celular (Neubauer)
Centrífuga (Sigma)
Centrífuga. Microcentrífuga (Biofugue Heraeus)
Congelador de -80°C (Giralt)
Congelador de -20°C
Contenedores de Nitrógeno líquido
Destilador de Agua (Millipore)
Estufa (Selecta)
Estufa de cultivo (Forma Scientific)
FACSort (Becton-Dickinson)
Filtro (Millipore)
Frascos de Cultivo
Guantes desechables
Jeringuillas estériles
Lector de ELISA (Biotek, Power-Wave XS, Izasa)
Liofilizador
Micropipetas (Gilson)
Papel de filtro
PHmetro (Crison)
Placas de cultivo de 6 y 96 pocillos

Pipetas desechables de 5 y 10 ml
Pipetas multicanales
Pipetas Pasteur
Tubos eppendorf de 1.5 ml
Tubos universales de 25 ml y 50 ml

1.2.- Tampones, medios y soluciones

Medio RPMI 1640 (Gibco)
Medio Dulbecco (Gibco, Paisley UK)
Medio Iscove (Sigma)
Tampón PBS (Phosphate Buffered Saline Solution): 10mM
Na₂HPO₄, 170mM NaCl, 3mM KCl, pH:7.2
PBS-EDTA: 0.2 g/l de EDTA en PBS

2.- Extracto de caléndula

LACE (Laser Activated Caléndula Extract) se ha obtenido a través de un nuevo método de extracción que consiste en:

- Descontaminación de las flores con agua.
- Machacamiento de las flores de forma manual.
- Tratamiento de las flores machacadas con láser a una longitud de onda de 250 nm durante 5-10 minutos.
- Posteriormente, maceración de 100-250 g de la planta tratada con láser en un litro de agua durante unos 7-15 días a 4-8° C. Durante este período se trató de nuevo con láser, diariamente durante 10 minutos.
- Separación de la fase líquida de la sólida por decantación o por decantación seguida de filtración utilizando filtros de

5 μm obteniéndose así un extracto ocre que es almacenado a -80°C hasta su uso.

- El extracto acuoso obtenido se somete a un proceso de liofilización y antes de ser utilizado en cultivos celulares es homogenizado en medio de cultivo (RPMI) y filtrado por filtros de $0.45\ \mu\text{M}$ para esterilización.

La solución stock obtenida por este procedimiento es de 10 mg/ml y dicha solución se diluye, en medio de cultivo para los ensayos *in vitro* o en suero fisiológico para ensayos *in vivo*, y así obtener las concentraciones deseadas. Las soluciones utilizadas en este estudio están en el rango de 2 mg/ml a $15\ \mu\text{g/ml}$.

Para la realización de algunos ensayos hemos utilizado además de este extracto acuoso, otros dos extractos atomizados a 80°C y 120°C .

3.- Cultivos celulares

3.1.- Líneas celulares

En este estudio se han empleado distintas líneas tumorales:

Ando-2	melanoma
AGS	carcinoma gástrico
MDA MB-231	carcinoma de mama
DU-145	adenocarcinoma de próstata
A549	carcinoma de pulmón
IMIN PC-1	carcinoma de páncreas
HeLa	carcinoma de cérvix
U937	leucemia monocítica
JURKAT	leucemia linfóide T
NKL	LGL leucemia
B16	melanoma murino
B9	fibrosarcoma murino

Todas estas líneas han sido obtenidas de American Type Culture Collection (Manassas, USA), con la excepción de: la ANDO-2 proporcionada por P. Coulie (Unidad de Genética Celular, Universidad de Louvain, Bruselas), la línea IMIN-PC1 obtenida por F.X. Real (Instituto Municipal de Investigaciones Médicas, Barcelona), el fibrosarcoma murino B9 producido en nuestro laboratorio y la línea leucémica NKL proporcionada por Dr. M. López-Botet (Universidad Pompeu-Fabra, Barcelona).

3.2.- Métodos de cultivo celular

El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, usando material y soluciones estériles. Las líneas: B9, B16, MDA MB-231, AGS, DU-145, A-549, IMIN PC-1 y HeLa fueron cultivadas en medio DMEM (GIBCO, Paisley, UK), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Life Technologies, Milan, Italy), glutamina 2mM, 500 µg/ml ampicilina y 40 µg/ml gentamicina (Genta-Gobens). La línea ANDO-2 fue cultivada en medio Iscove (Sigma).

Los PBLs (linfocitos de sangre periférica) y la línea leucémica NKL fueron cultivados en medio RPMI 1640, suplementados con glutamina 2mM, 500µg/ml ampicilina, 40 µg/ml gentamicina (Genta-Gobens) y un 10% suero fetal bovino (Life Technologies, Milan, Italy) en el caso de cultivo de PBLs, mientras que para el cultivo de la línea NKL al RPMI se le añade un 10% de suero humano AB (Sigma Chemical, St Louis, MO; USA) y 1µl/ml de medio de IL-2 humana recombinante (10000 UI/ml, Hoffmann-La Roche Nutley, NJ; USA). Para el cultivo se utilizaron frascos de cultivo estériles, placas de 6 pocillos o de 96 pocillos y la incubación se llevó a cabo en una estufa a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad.

El medio de cultivo fue cambiado de acuerdo con su acidificación, para lo que se despegaron las células adheridas al plástico del frasco de cultivo añadiendo una solución de PBS-EDTA, en el caso de líneas derivadas de tumores sólidos y no en PBLs o líneas leucémicas que no presentan adhesión al frasco o placa de cultivo. Una vez añadido el PBS-EDTA, las células se dejan incubar 10 minutos a 37°C, se golpea el frasco y las células se despegan debido a que el EDTA secuestra el Ca^{++} que es necesario para que las células permanezcan adheridas. A continuación, se pasa la suspensión celular a frascos universales estériles y se centrifuga a 200xg durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y el botón de células se resuspende en medio de cultivo nuevo, pasándolo posteriormente a otro frasco de cultivo. Cuando el frasco se satura las células se duplican en dos frascos de cultivo nuevos siguiendo el procedimiento anterior.

3.3.- Congelación de las células

Para conservar las líneas celulares durante un largo período de tiempo, se congelan las células en nitrógeno líquido. El proceso consiste en centrifugar las células a 200xg en frascos universales durante 5 minutos y resuspenderlas en suero fetal bovino inactivado con un 10% de DMSO (dimetil-sulfóxido). Se distribuyen en criotubos y se introducen rápidamente en el congelador de -80°C , pasándose a las 24h a nitrógeno líquido. Para descongelarlas se introducen en un baño a 37°C y posteriormente se lavan dos veces con PBS estéril, para eliminar los restos de DMSO. Por último, son resuspendidas en medio de cultivo y depositadas en frascos de cultivo.

3.4.- Lavado de las células

Esta operación se realiza para retirar los restos de medio de cultivo cuando las células van a ser sometidas a algún experimento posterior o cuando las células van a ser congeladas. Se centrifugan las células a 200xg durante 5 minutos y al botón celular se le añade 20ml de PBS estéril, volviéndose a centrifugar.

4.- Animales

Se han utilizado ratones inmunocompetentes (cepas: BALB/c, C57/BL6 y CBA) de 6 a 8 semanas de edad, con un peso medio aproximado de 20 g y ratas Wistar de 4-6 semanas de edad y de 150 g de peso, procedentes del animalario del H.U. Virgen de las Nieves. Los ratones BALB/c atímicos nu/nu fueron obtenidos de Charles River (CRIFFA, Barcelona). Los animales fueron manipulados en condiciones libres de patógenos y conforme a las normas aprobadas por nuestra institución.

5.- Proliferación *in vitro* de linfocitos de sangre periférica humanos (PBLs) tratados con LACE

Los linfocitos humanos se aíslan a partir de sangre venosa periférica mediante un gradiente de densidad en Ficoll Isopaque (Histopaque 1077, Sigma Diagnostics). En primer lugar, se diluye la sangre total con PBS y esta suspensión se deposita en un tubo con 3 ml de Ficoll. A continuación se centrifuga 30 minutos a 400xg a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se aspira

con una pipeta Pasteur la interfase opaca que queda entre el Ficoll y el plasma, que es la que contiene las células mononucleares.

Para la realización de este ensayo utilizamos el Kit Anti-BrdU colorimétrico, Cell Proliferation ELISA (Roche Diagnostics), una alternativa al ensayo radiactivo de incorporación de [³H] timidina. El fundamento de este test es la incorporación de BrdU, un análogo de la pirimidina, a las nuevas células sintetizadas ocupando el lugar de la timidina. Después de esta incorporación en el DNA, el BrdU es detectado por inmunoensayo.

El protocolo a seguir es el siguiente:

- ◆ Los PBLs obtenidos con este método se cultivan en una placa de 96 pocillos en medio de cultivo completo, en un número de 5×10^4 células/pocillo, a 37°C en una atmósfera del 90% humedad y con 5% de CO₂. Se ponen de 12-24 pocillos con las mismas concentraciones de células y de extracto. Cada ensayo se realiza como mínimo tres veces.
- ◆ Los PBLs se tratan durante 72 horas con distintas concentraciones de LACE (2 mg a 15 µg/ml) con el fin de conseguir un efecto dosis-respuesta y como controles positivos se cultivan con Concanavalina A o Fitohemaglutinina (PHA) a unas concentraciones que oscilan entre 10 µg y 1.25 µg/ml obteniéndose un volumen final de 150 µl/pocillo.
- ◆ Después de 48 h en cultivo en presencia o ausencia de LACE se añaden 15 µl/pocillo de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) a una concentración final de 10 µM y se deja incubar otras 24 horas.
- ◆ A las 72 horas, las células se centrifugan a 300xg durante 10 minutos, se aspira el medio de cultivo de todos los pocillos y se fijan las células por calor (60° C en una estufa durante 1 hora).

- ◆ Se añaden 200 µl/pocillo de Fix Denat y se deja incubar 30 min a 15-25 °C con el fin de provocar la desnaturalización del DNA necesaria para mejorar la incorporación del anticuerpo anti-BrdU.
- ◆ Después de este tiempo, se aspira el Fix Denat, se añade 100 µl/pocillo de solución del anticuerpo Anti-BrdU y se deja incubar 90 minutos a 15-25° C o 1 h a 37°C. El Anti-BrdU se une así al BrdU incorporado al DNA.
- ◆ Tras esta incubación se realizan tres lavados con 200-300 µl/pocillo de solución de lavado. Después de realizar el último lavado se aspira la solución de lavado, se añade 100 µl/pocillo de TMB (tetramethyl-benzidine) como solución de sustrato y se deja incubar a 15-25 °C hasta observar un cambio de color suficiente como para ser detectado fotocolorimétricamente (5 a 30 min).
- ◆ La reacción se cuantifica con la medición de las absorbancias usando un espectrofotómetro multipocillos (Biotek, Power-Wave XS) a una longitud de onda de 450 nm (referencia longitud de onda), en varios tiempos, tras añadir la solución de sustrato con el fin de determinar el resultado óptimo para cada célula.

La intensidad del color o lo que es lo mismo, los valores de las absorbancias se correlacionan con la cantidad de síntesis de DNA y por lo tanto con la proliferación de las células en los microcultivos.

Medio de cultivo solo y células incubadas con anti-BrdU en ausencia de BrdU fueron usados como control de marcajes no específicos.

6.- Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Líneas celulares tumorales humanas son cultivadas en placas de 96 pocillos, en un número de 3×10^3 - 5×10^3 /pocillo, durante 48-72 horas, con el medio de cultivo más adecuado para

su crecimiento (Dulbecco, Iscove, RPMI) al que se le añade un 10% de suero fetal bovino o humano en el caso de la línea NKL y distintas concentraciones de LACE (2 mg-15 µg/ml) en un volumen final de 150 µl/pocillo. Cada 48 horas el medio de cultivo es reemplazado y se añade nuevo extracto de caléndula.

Se ponen como controles, pocillos sin LACE y en el caso de la línea celular NKL, se ponen como controles pocillos con IL-2 recombinante humana (1 µl/ml de 10000 U/ml de IL2) ya que esta línea es dependiente de IL-2 para su crecimiento.

La cuantificación de la proliferación de estas líneas se va a realizar por lectura por ELISA con el Kit AntiBrdU colorimétrico, Cell Proliferation ELISA (Roche Diagnostics). Así, después de 48-96 h de cultivo en presencia o ausencia de LACE se añade 15 µl/pocillo de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) de 10 µM de concentración y se deja incubar de 1 a 3 horas. A continuación las células son procesadas siguiendo el mismo protocolo del apartado anterior. Medio de cultivo solo y células incubadas con anti-BrdU en ausencia de BrdU fueron usadas como control de uniones no específicas. Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces y los pocillos fueron puestos por triplicado.

De forma paralela, la proliferación celular también se determinó *in vitro*, directamente con el recuento celular con Trypan Blue. De esta manera, las líneas celulares se mantuvieron en cultivo en frascos de cultivo o en placas de 6 pocillos (NKL y JURKAT) durante 2, 4 o 6 días con LACE a una concentración de 250 µg/ml o 1 mg/ml. Se partió de un número inicial de células de 1.5×10^5 a 2×10^5 y se cultivaron con los medios de cultivo más adecuados para su crecimiento. Cada dos días se cambió el medio de cultivo suplementado con 250 µg/ml de LACE. Las células incubadas con medio de cultivo solo fueron usadas como control.

Al cabo de 4 o 6 días (depende del crecimiento de cada línea celular) se aspiraron las células de las placas de 6 pocillos (NKL) con ayuda de una pipeta Pasteur o se despegaron de los frascos de cultivo con PBS EDTA y se centrifugaron en un tubo universal a 300xg (U937, NKL y JURKAT) o a 200xg (líneas derivadas de tumores sólidos). Seguidamente, las células centrifugadas se resuspendieron en un volumen determinado de PBS y una pequeña muestra de esta suspensión celular se diluyó en 0.4% de Trypan Blue. De esta dilución marcada se coge un pequeño volumen con una pipeta Pasteur, se deposita en la cámara de Neubauer y se visualizan las células con un microscopio óptico invertido de contraste de fases (Olimpus). Las células marcadas por Trypan Blue serán las muertas y las no marcadas serán las viables, contadas en cada uno de los cuatro cuadrantes de las esquinas y en el cuadrante central. Cada línea celular fue contada de esta manera al menos tres veces.

7.- Análisis de las fases del ciclo celular

Se han realizado ensayos para identificar las distintas fases del ciclo celular utilizando el Kit "BrdU Flow" (BD Pharmigen). En este método, el BrdU (un análogo del precursor de la pirimidina del DNA) es incorporado en el DNA de las nuevas células sintetizadas en el lugar de la timidina y esta incorporación es marcada con anticuerpos específicos anti-BrdU fluorescentes y de forma opcional también se puede marcar con 7-amino actinomicina D (7-AAD) que se une al DNA total. Con esta incorporación de dos colores para el análisis por citometría de flujo se caracterizan las células que están activamente sintetizando

DNA (incorporación de BrdU, fase S) y las posiciones en el ciclo celular (G_0/G_1 , G_2/M , definidas por 7AAD).

El protocolo a seguir es el siguiente:

- Los PBLs humanos obtenidos por el método del Ficoll se cultivan en placas de 6 pocillos a 37°C y en una atmósfera húmeda con CO_2 , durante 96 horas en un número de 5×10^5 células por pocillo. Como medio de cultivo se utilizó RPMI completo al que se le añade LACE a unas concentraciones que oscilaban entre 1mg/ml a 250 μ g/ml. Como control negativo utilizamos PBLs sin tratar y como controles positivos IL-2 y Concanavalina A.

Del mismo modo, las líneas celulares tumorales humanas se cultivan en frascos de cultivo durante 96 horas a 37°C con LACE a unas concentraciones que oscilan entre 1mg/ml a 250 μ g/ml, y como controles se utilizaron líneas tumorales sin tratar.

- A las 72 horas de mantener las células en cultivo se marcan durante 1 hora o 24 horas con Bromo-desoxiuridina (Brd-U) (10 μ l/ml de medio a una concentración de 1mM) que se incorpora al DNA de las nuevas células sintetizadas.
- Después de esta incubación, las células se aspiran de sus pocillos, se lavan dos veces con 1 ml de Staining buffer y se centrifugan a 200-300xg. Posteriormente, se resuspenden las células y se permeabilizan con 100 μ l de Cytotfix/Cytoperm buffer por tubo (15 a 30 minutos de incubación a temperatura ambiente o en hielo).
- A continuación se vuelven a lavar las células con 1 ml de Wash Buffer y una vez resuspendidas se incuban durante 10 min en frío con 100 μ l BD Cytoperm Plus Buffer.
- Las células son lavadas de nuevo con 1 ml de Wash/Buffer y se repite la incubación con 100 μ l de Cytotfix/Cytoperm durante 5 minutos a temperatura ambiente o en frío.

- Una vez que las células han sido permeabilizadas y fijadas se realiza el último lavado con 1 ml de Wash/Buffer, las células resuspendidas se tratan con 100 μ l de DNasa a una concentración de 30 μ g/ml por cada tubo, durante 1 hora a 37°C.
- Posteriormente, se lavan las células, se añade 50 μ l del anticuerpo fluorescente específico anti-BrdU (1/50) y se deja incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Tras lavar las células con 1 ml de Wash Buffer, se incuban durante 20 minutos (a temperatura ambiente o en frío) con 20 μ l de 7 aminoactinomicina D (7AAD) que se une al DNA total y se protegen de la luz.
- Por último y tras lavar las células con Wash Buffer, se resuspenden en 1 ml de Staining Buffer y se procede al análisis de al menos 50.000 células, por citometría de flujo mediante FACScan (Becton-Dickinson) utilizando el programa Cell ProQuest.

8.- Ensayo de Anexina V para detectar células apoptóticas

Para este ensayo de apoptosis se ponen en cultivo PBLs humanos (5×10^5 células/pocillo) y las líneas tumorales mencionadas anteriormente (15×10^4 células/falcon), con los medios de cultivo más adecuados para su crecimiento y con LACE a una concentración de 1 mg/ml y 250 μ g/ml durante 4 días a 37°C y con 5% de CO₂. A los dos días de poner en cultivo las células se reemplaza el medio de cultivo con la concentración de LACE correspondiente.

Después de 4 días en cultivo las células que no se adhieren se recogen en tubos universales, las que presentan adhesión al frasco de cultivo se despegan con PBS EDTA y se pasan a un tubo universal junto con las células que están flotando en los

frascos de cultivo. A continuación las células se lavan dos veces con PBS y se resuspenden en Binding Buffer en una concentración de 1×10^6 células por ml. Unos 100 μ l de esta solución se incuban con 5 μ l del anticuerpo Anexina V (BD Biosciences) y 5 μ l de 7 amino-actinomicina D (7-AAD) a temperatura ambiente durante 15 min y en la oscuridad. Después de este tiempo se añade 400 μ l de Binding Buffer por tubo para el análisis por citometría de flujo con el programa Cell ProQuest.

9.- Expresión de caspasa-3

Se ha usado el anticuerpo monoclonal conjugado FITC de Caspasa-3 (BD Biosciences) para determinar si la proteasa Caspasa-3 está involucrada en la apoptosis de células tratadas con LACE. Así después de mantener las células en cultivo durante 4 días con LACE del mismo modo que el comentado en el ensayo anterior, se recogen tanto las células que están flotando como las pegadas, en este caso con ayuda de PBS EDTA, se lavan dos veces con PBS, se fijan y se permeabilizan con Cytofix/Cytoperm Buffer a una concentración de 1×10^6 células por 0.5 ml por tubo durante 20 min en hielo. A continuación, se lavan dos veces con 0.5 ml de Perm Wash Buffer/ 1×10^6 células a temperatura ambiente y las células resuspendidas se incuban con el anticuerpo monoclonal conjugado FITC anti-actividad caspasa-3 durante 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Tras la incubación, las células se lavan dos veces con Perm Wash Buffer y después del último lavado se añaden 500 μ l de Perm Wash Buffer para finalmente ser analizadas por el citómetro.

10.- Detección de expresión de ciclinas

Para la realización de este ensayo se cultivan las líneas tumorales AGS y JURKAT en presencia o ausencia de 250 µg/ml de LACE durante 96-144 horas, renovándose cada 48 horas el medio de cultivo y añadiendo nuevo LACE. Después de este período las células se recogen, se lavan dos veces con PBS, se resuspenden en Staining Buffer y se centrifugan. Al pellet obtenido se le añade Citofix/Citoperm y se deja incubar 30 minutos a 4°C. A continuación, a estas células ya fijadas y permeabilizadas, se les añade 20 µl de los anticuerpos anti-Ciclina D1 y anti-Ciclina E (BD Pharmingen) a una concentración de 1×10^6 de células, durante 30 minutos. Como control, se utiliza un isotipo control de los anteriores anticuerpos en el mismo volumen. Después de esta incubación se lavan las células y se añade 10 µl ioduro de propidio durante 10 minutos. Por último se lavan las células y se resuspenden en Staining Buffer para el análisis por citometría de flujo.

11.- Análisis de factores transcripcionales implicados en el ciclo celular

Se realizó un ensayo para identificar distintos factores transcripcionales: E2F1, E2F2, DP1, p107 y Rb, implicados en la regulación del ciclo celular. Las líneas tumorales humanas AGS y JURKAT se cultivaron durante 96-144 horas con LACE. Como controles se utilizan estas células sin tratar. En primer lugar, una vez cultivadas las células se recogen y se procede a la extracción de proteínas nucleares con el Kit TransFactor Extraction (BD Biosciences). Se lavan las células 2 veces con PBS, se estima el volumen del pellet obtenido, se añade un volumen de buffer de

lisis equivalente a 5 veces el volumen de células y se deja incubar 15 minutos en hielo. A continuación, se centrifugan, se decanta el sobrenadante y se añade de nuevo un volumen de buffer de lisis equivalente a 2 veces el volumen del pellet. Esta suspensión se carga en una jeringa y se pasa de forma enérgica por una aguja del número 27, se repita este paso 10 veces y se centrifuga 20 minutos a 11.000xg. El sobrenadante que se obtiene será la fracción citosólica. Para la extracción nuclear, se resuspende el pellet en 2/3 de su volumen de Extraction Buffer, se carga esta suspensión en una jeringa y se vuelve a pasar 10 veces por una aguja del número 27. Esta suspensión se deja incubar 30 minutos a 4°C con agitación. Tras la centrifugación a 13.000xg durante 15 minutos se recoge el sobrenante que contiene la fracción nuclear. Las proteínas obtenidas se cuantificaron con el Kit RC DC Protein Assay (BioRad) y las absorbancias se midieron a 750 nm por espectrofotometría. A continuación, se siguió el protocolo descrito en el Kit BD TransFactor (BD Biosciences). Así, se añade 5 µg o 20 µg de proteínas nucleares tanto de las células tratadas como no tratadas en un volumen de 50 µl de Transfactor Buffer Blocking por pocillo y se deja incubar 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizan 4 lavados con 150 µl de Transfactor Buffer y se incuban con 100 µl de anticuerpo correspondiente, 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esta incubación se lavan los pocillos 4 veces con 250 µl de Transfactor Buffer y se añaden 100 µl de TMB sustrato. Una vez conseguida la coloración azul, la reacción se para con 100 µl de solución stop por pocillo y se realiza la lectura con un lector de ELISA a 655 nm (Biotek, Power-Wave).

12.- Western Blot

El estudio de las proteínas: CDK1/Cdc2, CDK2, CDK4, ciclina A, Ciclina B, Ciclina D3, p19, p36/MAT1, PCNA, Rb, Rb2 y RBBP implicadas en el ciclo celular se realizó por Western-Blot. Se cultivaron células tumorales de las líneas AGS y JURKAT con LACE a una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ durante 96-144 horas, retirándose el medio de cultivo cada dos días y añadiendo nuevo LACE. Como control se utilizaron células de estas dos líneas cultivadas con medio de cultivo sólo. A continuación, se procede a la extracción de proteínas totales siguiendo el protocolo descrito en el Kit TransFactor Extraction (BD Biosciences). En primer lugar, se despegan las células con PBS-EDTA, se realizan 2 lavados con PBS, se decanta el sobrenadante y se estima el volumen del pellet. Se añade un volumen de Buffer de lisis equivalente a 5 veces el volumen del pellet y se incuba 30 minutos en hielo. Tras la centrifugación de la solución a 13.000 x g durante 30 minutos se recoge el sobrenadante que contiene las proteínas totales. Estas proteínas se cuantifican, antes de realizar el ensayo, con el Kit RC DC Protein Assay. Se realizó una electroforesis de 35 a 40 μg de proteínas, en Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) (1:2) a la que le añadimos 2-mercaptoethanol (Sigma), en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (Ready Gel, 10% Tris-HCl, Bio-Rad). Se somete a un voltaje de 100 V durante 60-90 minutos, en solución 1x Tris Glycine SDS. Como peso molecular se utilizó Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard (Bio-Rad). Tras realizar la electroforesis, se transfiere el gel a una membrana, siguiendo el protocolo del Kit, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). A continuación, se equilibra el gel y las membranas de PVDF (polyvinylidene difluoride) en Transfer Buffer (25 mM Tris, 192 M Glycine, 0.1% SDS, 20% de metanol). Se prepara el

sándwich con la membrana y el gel y la transferencia se realiza a un voltaje de 100 V durante 60-90 minutos. Después de esto, la membrana se lava tres veces con agua bidestilada y seguidamente se realizan 2 lavados de cinco minutos cada uno con PBST (PBS con 0.1% de Tween-20). A continuación, se bloquea la membrana durante 1 hora con una solución 3% Blocker (665 ml de PBST con 20 g de leche semidesnatada en polvo, Blotting Grade Blocker, Bio-Rad). Después de este período se realizan dos lavados con PBST y se incuba la membrana con los primeros anticuerpos (anti-Cdk1/Cdc2, Cdk2, Cdk4, ciclina A, Ciclina B, Ciclina D3, p19, p36/MAT1, PCNA, Rb, Rb2, RBBP) durante 90 minutos. Seguidamente la membrana se lava 2 veces con PBST y se incuba 60 minutos con el segundo anticuerpo (Goat anti-Mouse IgG-HRP, BD Biosciences Pharmingen). Por último, se realizan dos lavados con PBST, y se añade una solución colorimétrica, Opti-4CN (Bio-Rad) durante 5 a 30 minutos, hasta detectar el nivel deseado.

13.- Estudio de subpoblaciones de PBLs tratados con LACE

PBLs humanos obtenidos de sangre periférica tras centrifugación por gradiente de Ficoll se resuspenden en PBS para ser contados con una cámara de Neubauer. A continuación, 5×10^5 células se cultivan en medio sólo (células control) o con LACE, a unas concentraciones de 250 $\mu\text{g/ml}$ y 1 mg/ml , en placa de 6 pocillos en un volumen de 4 ml por pocillo, durante 4 días a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO_2 . A las 72 horas, se añade BrdU a las células en cultivo y se deja incubar durante 24 horas. Después de esta incubación, las células se aspiran con una pipeta Pasteur, se lavan dos veces con PBS y se incuban con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo: anti-CD4,

anti-CD3, anti-CD19, anti-CD56, anti-CD69; anti-BrdU y anti-DR (Becton-Dickinson) durante 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Una vez incubadas las células con los anticuerpos, se lavan de nuevo con PBS, se resuspenden en Staining Buffer y se analizan unas 10.000 células por citometría de flujo con el programa Cell ProQuest (Becton-Dickinson).

14.- Ensayos *in vivo*

14.1.- Protocolo de toxicidad *in vivo*

Para los ensayos de seguridad biológica se hicieron diferentes grupos de animales, cada grupo compuesto por 10 animales, a los que se les administran diferentes dosis del LACE.

Los ensayos se realizaron en tres cepas de ratones inmunocompetentes: Balb/c, CBA y C57/BL6 de 6-8 semanas de edad y con un peso aproximado de 20 g por ratón. También se han empleado ratas Wistar de unos 4-6 semanas de edad y con un peso aproximado de 150 g obtenidas del animalario del H.U Virgen de las Nieves. Los animales fueron manipulados en condiciones libres de patógenos y conforme a las normas aprobadas por nuestra institución. LACE fue administrado oralmente por cánula una vez al día durante 4 semanas. De cada cepa se pusieron 5 grupos, compuestos cada uno por 10 ratones, denominados según la dosis administrada:

- **Control:** se le administró 200 µl de agua
- **LACE-A:** se le administró una dosis de LACE de 2.750 mg/Kg de peso en un volumen de 200 µl (solución 5X).
- **LACE-B:** se le administró a cada animal una dosis de LACE de 550 mg/kg de peso, en un volumen de 200 µl (Solución 1X).

- **LACE-C:** se le administró a cada animal una dosis de LACE de 55 mg/Kg de peso, en un volumen de 200 μ l (Solución 0.1X).

- **LACE-D:** se le administró a cada animal una dosis de LACE de 11 mg/kg de peso, en un volumen de 200 μ l (Solución 0.02X)

Después de este período los animales restantes fueron mantenidos durante un período adicional de un mes para evaluar los efectos tóxicos tardíos tras la administración reiterada del producto.

14.2.- Estudio de subpoblaciones de linfocitos en ratones tratados con LACE

Para la realización de este ensayo se han utilizado ratones Balb/c de 6 a 8 semanas de edad y con un peso aproximado de 20 g procedentes del animalario del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. A estos animales se les administró LACE por distintas vías y concentraciones. Se establecieron 6 grupos de ratones:

-Control: no se le administra nada.

-Control oral: se administra S.F. vía oral

-Control intraperitoneal: se administra S.F. vía intraperitoneal.

-Vía oral: se administra LACE a través de una cánula a una concentración de 50 mg/kg de peso (1 mg/ratón) tres veces por semana, durante 1, 2 o 4 semanas.

-Vía intraperitoneal: se administra LACE a una concentración de 25 mg/kg de peso dos veces a la semana, durante 1, 2 o 4 semanas.

-Taxol (paclitaxel): se administra vía intraperitoneal a una concentración de 5 mg/kg de peso (100 μ g/ratón) dos veces a la semana durante 1, 2 o 4 semanas.

Después de la administración de LACE durante 1, 2 o 4 semanas, se sacrifican los animales con la extracción de sangre

de la vena cava. La sangre es incubada con anticuerpos: Anti-CD23, anti-CD45, anti-CD49, PANK, anti-CD4, anti-CD3 y con el marcador de activación CD69 durante 30 minutos. Después de este tiempo se añade buffer de lisis de eritrocitos (PharM Lyse, BD Biodciences Pharmingen), se realizan lavados con PBS y se resuspende en 400 µl de Binding Buffer por tubo, para el análisis por citometría de flujo con el programa Cell ProQuest.

14.3.- Crecimiento local en ratones inmunocompetentes

Para los ensayos de crecimiento local hemos utilizado ratones machos de la cepa C57/BL6 de 6-8 semanas de edad y con un peso aproximado de 20 g por ratón, procedentes del animalario del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Se inyectaron subcutáneamente en la pata 5×10^5 células de la línea tumoral B16 (melanoma murino). Una vez inyectados, para evaluar el efecto *in vivo* de LACE, se establecieron 6 grupos distintos de ratones (10 ratones por grupo) empezándose a administrar el extracto o el S.F. el mismo día de la inyección de las células tumorales. Se hicieron los siguientes grupos:

-Control: no se le administra nada.

-Control oral: se administra S.F. vía oral

-Control intraperitoneal: se administra S.F. vía intraperitoneal.

-Vía oral: se administra LACE a través de una cánula a una concentración de 50 mg/kg de peso (1 mg/ratón) tres veces por semana.

-Vía intraperitoneal: se administra LACE a una concentración de 25 mg/kg de peso (0.5 mg/ratón) dos veces a la semana.

-Taxol (paclitaxel): se administra vía intraperitoneal a una concentración de 5 mg/kg de peso (100 µg/ratón) dos veces a la semana durante las 3 primeras semanas.

El crecimiento tumoral fue vigilado 3 veces a la semana, midiéndose el diámetro mayor del tumor.

Los ratones fueron manipulados en condiciones libres de patógenos y conforme a las normas aprobadas por nuestra institución.

14.4.- Crecimiento local en ratones atímicos (nu/nu)

Se han utilizado ratones atímicos (nu/nu) de 6-8 semanas y con un peso medio aproximado de 20 g procedentes de Charles River (Barcelona). Los ratones fueron manipulados en condiciones libres de patógenos. A estos animales se les inyectaron 5×10^6 de células del melanoma humano ANDO-2 y se establecieron 6 grupos distintos con 10 ratones cada uno:

-Control: no se le administra nada.

-Control oral: se administra S.F. vía oral

-Control intraperitoneal: se administra S.F. vía intraperitoneal.

-Vía oral: se administra LACE a través de una cánula a una concentración de 50 mg/kg de peso (1mg/ratón) tres veces por semana.

-Vía intraperitoneal: se administra LACE a una concentración de 25 mg/kg de peso (0.5mg/ratón) dos veces a la semana.

-Taxol (paclitaxel): se administra vía intraperitoneal a una concentración de 5 mg/kg de peso (100 μ g/ratón) dos veces a la semana durante las 3 primeras semanas.

Tanto el taxol, como LACE o el S.F. se comenzaron a administrar un día después de la inyección de las células tumorales.

El crecimiento tumoral fue vigilado 3 veces a la semana, midiéndose el diámetro mayor del tumor.

Resultados

1.- Ensayo de proliferación *in vitro* de linfocitos tratados con LACE

Para determinar el efecto *in vitro* de LACE sobre linfocitos humanos de sangre periférica (PBLs) se realizó una curva dosis-respuesta, utilizando concentraciones de LACE de 15.62 $\mu\text{g/ml}$ a 2 mg/ml y la proliferación fue medida por la incorporación de BrdU al DNA de las células.

En la **Figura 8** se muestran las absorbancias obtenidas cuando los PBLs se cultivan en una placa de 96 pocillos en un número de 5×10^4 células/pocillo, durante 72 horas con 8 concentraciones distintas de LACE que oscilan desde 0 (control: linfocitos cultivados sin LACE) hasta 2 mg/ml, siendo la concentración 1 de 15.62 $\mu\text{g/ml}$, la 2 el doble de la primera y así sucesivamente hasta alcanzar los 2 mg/ml de la concentración número 8 (**Figura 8**). Como se puede observar, las absorbancias muestran un incremento de proliferación de PBLs humanos, de 2 a 5 veces superior al control, consiguiéndose la mayor proliferación con las concentraciones de 125, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$. Por otra parte, esta proliferación la podemos comparar con dos controles positivos, la Concanavalina A (10 $\mu\text{g/ml}$, 1.25 $\mu\text{g/ml}$) y la IL-2. Si consideramos el 100% de proliferación el valor de las absorbancias cuando PBLs son cultivados con Concanavalina A podemos decir, que la proliferación alcanzada cuando PBLs son cultivados con LACE, ronda entre un 17%, obtenida con la proliferación número 1, hasta un 36% obtenida con la concentración 5 y 6 (250 y 500 $\mu\text{g/ml}$) (**Figura 8**). Si las absorbancias obtenidas con LACE las comparamos con las obtenidas con IL-2, observamos que representan desde un mínimo de 26% con la concentración número 1 (15.62 $\mu\text{g/ml}$) hasta un máximo del 54% con la concentración número 5 y 6 (250 $\mu\text{g/ml}$)

(Figura 8). Si los resultados son expresados como índice de estimulación (IE:absorbancia de linfocitos tratados dividido por absorbancia de linfocitos no tratados) el $IE_{LACE} = 2.5$, $IE_{IL-2} = 4.4$, $IE_{conA} = 6.5$. Es importante destacar, que los PBLs no fueron sometidos a ninguna estimulación previa. Cuando conjuntamente se cultivan los PBLs con LACE y Concanavalina A o con IL-2 los niveles de proliferación obtenidos son similares a los encontrados con IL-2 o Concanavalina A solos.

Estos ensayos también fueron realizados usando un extracto de *caléndula* sin tratar con láser, al que llamamos CE, las absorbancias fueron prácticamente idénticas, indicando que ambos extractos presentan similares incrementos de proliferación de PBLs.

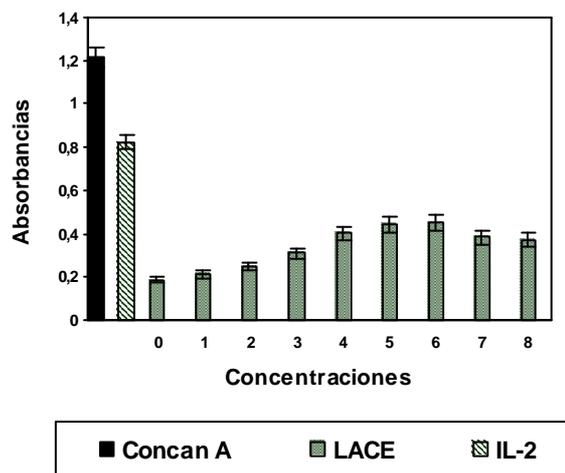


Figura 8. Efecto dosis-respuesta de PBLs cultivados en placas de 96 pocillos (5×10^4 células/pocillo) en presencia de 8 concentraciones de LACE ($15.62 \mu\text{g/ml}$ a 2 mg/ml) durante 72 horas. La proliferación fue determinada por un ensayo colorimétrico de BrdU (Cell proliferation ELISA). Como controles negativos representamos PBLs cultivados con medio de cultivo solo (concentración 0) y como controles positivos los PBLs se cultivan con IL-2 y Concanavalina A. Cada columna representa la media de 3 ensayos independientes \pm SD

Se quiso esterilizar el extracto, a través de un método de atomización a 80° C y a 120° C. Tras someter LACE a este proceso se realizaron ensayos de proliferación de PBLs para evaluar su actividad biológica. Los resultados muestran que con el extracto acuoso a unas concentraciones de 125 µg/ml, 250 µg/ml y 1 mg/ml, se consigue un incremento de proliferación de PBLs superior al obtenido con el extracto atomizado a 80°C (at. I) y a 120°C (at. II) (**Figura 9**). La actividad obtenida con el atomizado a 80°C representa un 30% respecto al extracto acuoso con la concentración de 125 µg/ml y de un 7% con la concentración de 250 µg/ml y 1 mg/ml. Con el extracto atomizado a más de 120°C observamos que los niveles de absorbancias obtenidos vienen a ser de tan solo un 7.23% respecto a los obtenidos con el extracto acuoso (**Figura 9**). De esta manera, podemos decir que con el extracto atomizado a más de 120 °C se pierde prácticamente esta actividad mitógena.

Todos estos ensayos se realizaron al menos tres veces y se pusieron de 12-24 pocillos, con el mismo producto y concentraciones, obteniendo finalmente unas medias que son las representadas en la figura.

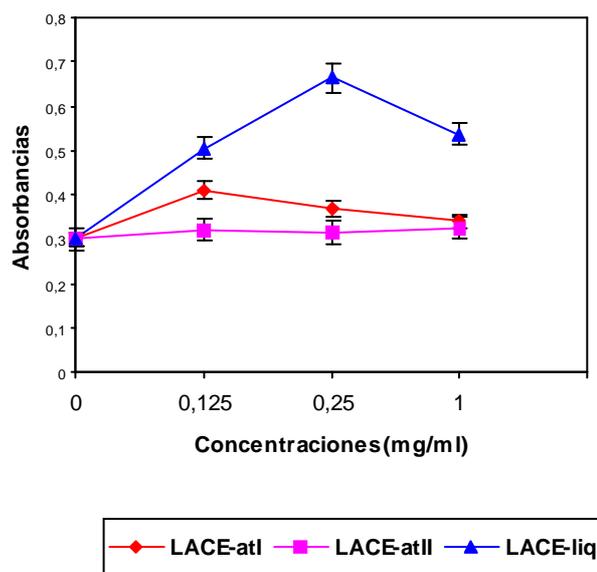


Figura 9. Comparación de la proliferación de PBLs, por un ensayo colorimétrico de BrdU (Cell proliferation ELISA), tras ser cultivados durante 72 h con 3 concentraciones distintas de caléndula sometida a distintos procesos: un extracto líquido (LACE-liq), un extracto atomizado a 80°C (LACE-at I) y un extracto atomizado a más de 120°C (LACE-at II). Se representan la medias \pm SD de tres ensayos independientes

2.- Estudio del ciclo celular de PBLs

Como hemos visto en los resultados anteriormente comentados, los PBLs proliferan en presencia de este extracto, lo que no ocurre cuando son cultivados sólo con medio de cultivo, por lo que decidimos estudiar las modificaciones que se producen en el ciclo celular. Cuando PBLs humanos son cultivados *in vitro* con solo medio de cultivo, la mayoría de los linfocitos, un 88.55%,

se encuentran en la fase G_2/M , es decir, estos no son capaces por sí solos de entrar en ciclo celular y dividirse (**Figura 10**). Sin embargo, cuando los PBLs son cultivados durante 96 horas con medio de cultivo al que se le añade 250 $\mu\text{g/ml}$ LACE, se produce una entrada de estas células en el ciclo celular, pudiéndose identificar las distintas fases del ciclo celular de unas células que están proliferando. De esta manera, nos encontramos un 19.62% de los linfocitos en fase S, un 33.44% en fase G_2/M y un 22.23% en fase G_0/G_1 (**Figura 10**).

Del mismo modo, los PBLs también entran en ciclo celular cuando son cultivados durante 96 horas con 1 μl de IL-2/ ml de medio de cultivo (10000 U/ml), encontrándonos los siguientes porcentajes: un 11.24% en fase S, un 44.79% en fase G_2/M y un 7.24% en fase G_0/G_1 .

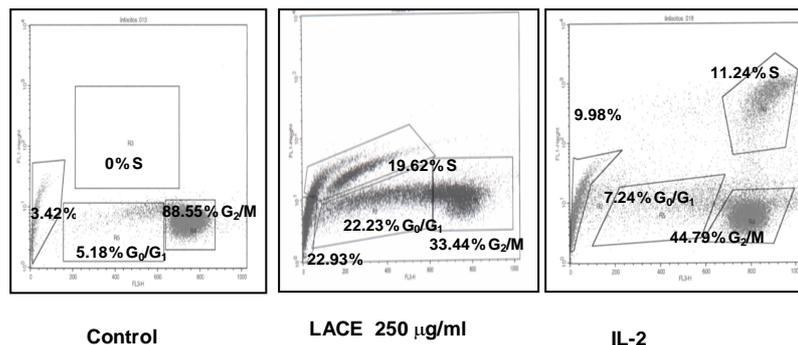


Figura 10. Análisis de la distribución de linfocitos en el ciclo celular, tras se cultivados durante 96 h con 250 $\mu\text{g/ml}$ de LACE y con IL-2. Como control se cultivan PBLs con medio de cultivo solo. Los datos indican el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Se muestran los resultados de un ensayo representativo de los tres analizados

3.- Análisis *in vitro* de subpoblaciones de PBLs activadas por LACE

Se analizaron las diferentes subpoblaciones de PBLs humanos que proliferan *in vitro* después del tratamiento con LACE. Las diferentes subpoblaciones fueron analizadas por citometría de flujo, marcando PBLs tratados y no con LACE con anticuerpos monoclonales: antiCD4, antiCD19, antiCD56, antiCD3, antiCD5; y con los marcadores de activación CD69 y DR. En PBLs control, las subpoblaciones son 46.27% CD4+, 10.91% CD19+ y 4.64% CD56+/CD3+ (**Figura 11**). Los PBLs tratados con LACE presentan un incremento significativo de células CD4+, CD19+ y CD56+/CD3+ en relación al cultivo control con porcentajes de: 59.15% CD4+, 37.71% CD19+ y 92.24% CD56+/CD3+ (**Figura 11**). De esta manera, el análisis de subpoblaciones indican que las células en proliferación son principalmente: linfocitos B, linfocitos T CD4+ y linfocitos NKT. Tras la incubación de PBLs con los marcadores de activación CD69 y DR se obtiene un 8.48% de linfocitos positivos para CD4 y CD69 en el control, y un 27.86% cuando los PBLs son tratados con LACE. Del mismo modo, de un 9.58% de linfocitos CD19 y DR positivos en el control, pasamos a un 25.19% en las células tratadas con LACE (**Figura 11**).

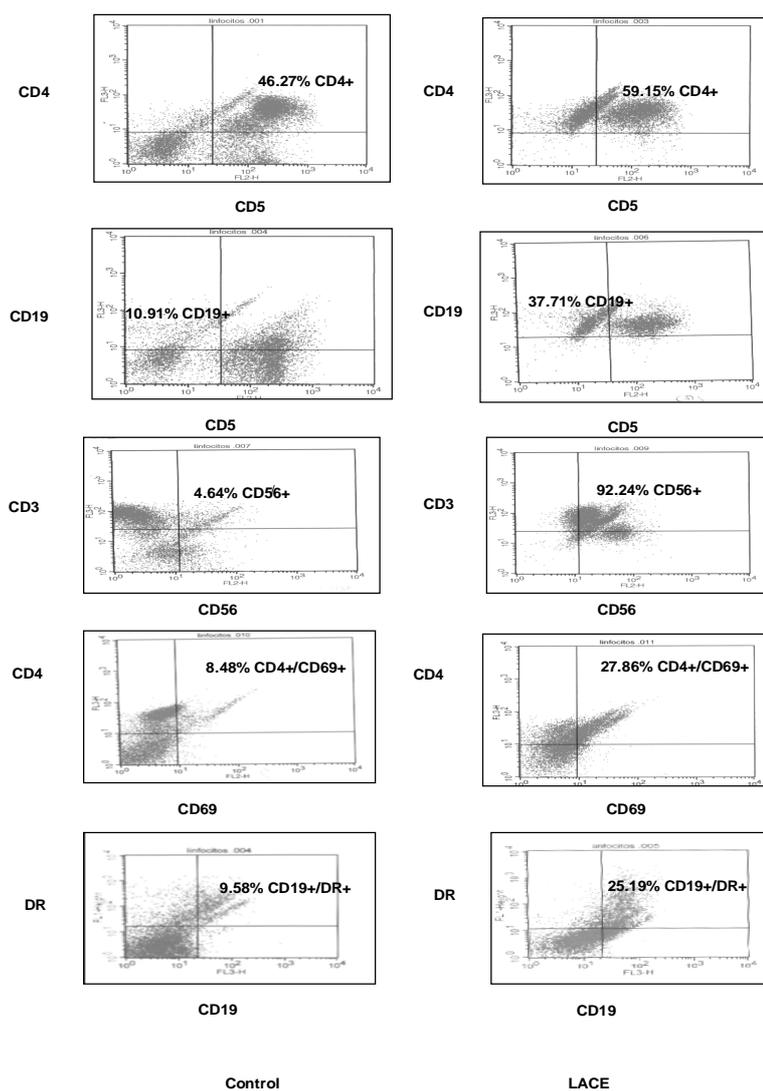


Figura 11. Análisis por citometría de flujo de subpoblaciones y activación linfocitaria. PBLs tratados durante 72 h con 250 $\mu\text{g/ml}$ de LACE son incubados con anticuerpos monoclonales: CD4, CD19, CD3, CD56, CD5, DR y CD69. Los porcentajes indican las células positivas para cada uno de los anticuerpos empleados. Los datos son representativos de 3 ensayos independientes

4.- Efecto de LACE sobre el crecimiento de líneas celulares tumorales.

Como hemos mostrado, los PBLs sufren un incremento de proliferación al cultivarse en presencia de LACE. A continuación, nos planteamos qué ocurriría cuando las células tumorales se cultivaran *in vitro* con este extracto. Se realizó un estudio dosis-respuesta utilizando el fibrosarcoma murino B9. Estas células fueron cultivadas en una placa de 96 pocillos en un número de 2.5×10^3 /pocillo con ocho concentraciones distintas de LACE que oscilaron entre 2 mg/ml (concentración número 8) a 15.6 µg/ml (concentración 1) durante 48-72 horas. Al cabo de este tiempo se incubaron las células con BrdU durante 2-3 h. Los resultados mostraron que las células tratadas con LACE presentan unas absorbancias inferiores a las encontradas en el control principalmente en un rango de concentraciones de 125 µg/ml a 500 µg/ml (**Figura 12 a**). La concentración número 0 (control) representa las células con medio de cultivo solo. Si se considera una proliferación del 100% la obtenida en estas células control, podemos decir que las absorbancias alcanzadas cuando las células se tratan con LACE ronda entre 60-28%, alcanzándose la máxima inhibición con la concentración 4 y 5 (250 y 125 µg/ml) (**Figura 12 a**). Similares resultados fueron encontrados con el carcinoma de cérvix, HeLa y con el melanoma humano Ando-2.

Cuando estos ensayos fueron realizados con el extracto no tratado con láser, la disminución de las absorbancias fue notablemente inferior (**Figura 12 b**). Estos resultados indican que el extracto de caléndula sin láser (CE) produce menor inhibición de la proliferación celular en comparación con el extracto LACE.

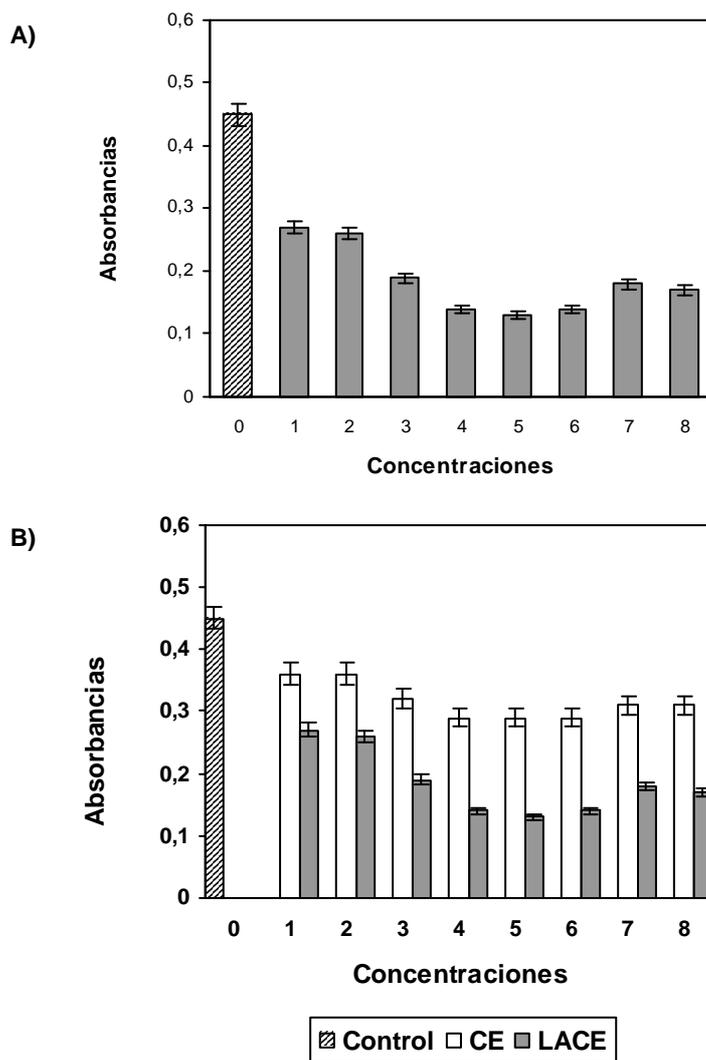


Figura 12 a. Efecto dosis-respuesta del fibrosarcoma murino B9 en presencia del extracto de LACE. B9 se cultiva en una placa de 96 pocillos (2.5×10^3 células/pocillo) en presencia de varias concentraciones de LACE ($15.62 \mu\text{g/ml}$ a 2 mg/ml) durante 72 horas. El crecimiento de B9 fue determinado por un ensayo colorimétrico de BrdU (Cell proliferation ELISA). En la **Figura 12 b** se compara el efecto de la caléndula tratada con láser (LACE) con un extracto de caléndula sin tratar (CE) en la línea B9. Como controles representamos B9 cultivado con medio de cultivo solo en las mismas condiciones. Cada columna representa la media de tres ensayos independientes \pm SD

Después de realizar esta curva dosis-respuesta, decidimos utilizar la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de LACE para llevar a cabo los ensayos posteriores. Las líneas tumorales MDA MB-231, B16, ANDO 2, JURKAT y NKL fueron cultivadas con 250 $\mu\text{g/ml}$ de LACE. Como podemos observar en la **Figura 13**, las absorbancias presentan una disminución respecto al control. En el caso de las líneas MDA MB-231, ANDO2 y JURKAT los niveles de absorbancia cuando estas células son cultivadas con LACE son semejantes a las absorbancias obtenidas con el número inicial de células, es decir, no existe proliferación alguna. En el caso de las líneas murinas B16 y B9, la absorbancias obtenidas son inferiores a los controles representando un 24% y un 30% de proliferación respectivamente respecto al control. La línea MDA MB-231 y ANDO-2 fueron cultivadas también con taxol, obteniéndose unos niveles de absorbancia semejantes a los obtenidos con LACE (**Figura 13**).

Como excepción de las líneas estudiadas, se encontró la línea leucémica NKL. Esta línea celular es dependiente de IL-2 para su crecimiento, no proliferando en ausencia de IL-2 (**Figura 13**). Cuando estas células se tratan con LACE se inducen unos niveles de proliferación similares a los obtenidos con IL-2, concretamente se obtiene una proliferación del 93% en comparación a IL-2. Así con los resultados expuestos, podemos ver dos comportamientos distintos del LACE:

- Un aumento de la proliferación de PBLs y de la línea celular NKL
- Una disminución del crecimiento de líneas celulares tumorales

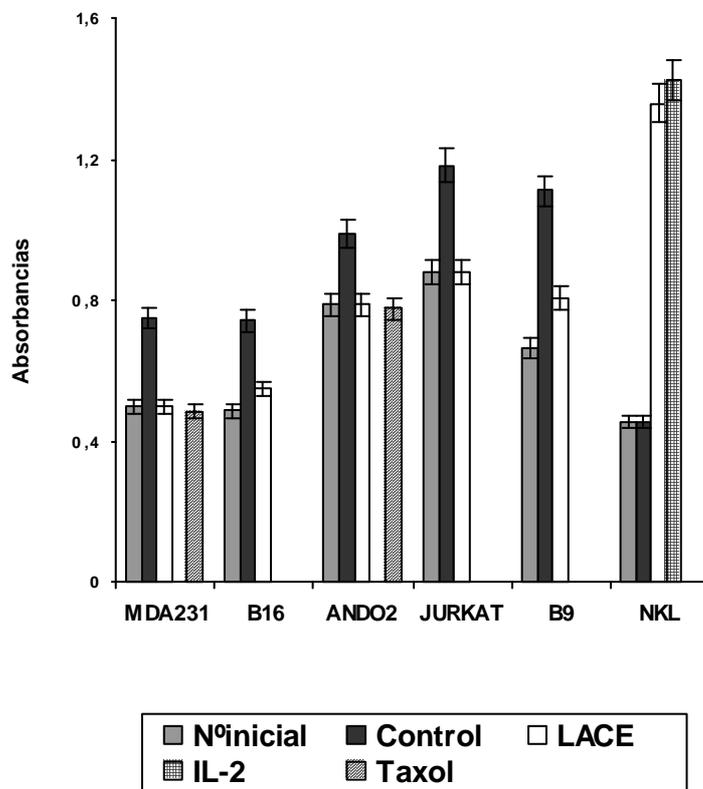


Figura 13. Acción de diferentes líneas tumorales (MDA MB-231, B16, ANDO-2, JURKAT, B9 y NKL) después de 96 h en presencia de 250 $\mu\text{g/ml}$ de LACE. Como control se utilizaron células cultivadas con medio de cultivo solo y en el caso de la línea NKL se cultiva con IL-2 necesaria para el crecimiento de esta línea celular. La línea MDA MB-231 y ANDO2 se cultivó con taxol (paclitaxel). Todas las células fueron analizadas por un ensayo colorimétrico de BrdU y las absorbancias fueron leídas a 450 nm. Cada columna representa la media de 3 ensayos realizados independientemente \pm SD

A continuación, se determinó la equivalencia de este descenso en los valores de absorbancias con el número de células. Se realizó recuento celular tras mantener las células AGS, DU145, HeLa, IMIN PC-1, A549, DLD1, U937, B9, MDA MB-231, B16, ANDO2, JURKAT y NKL en cultivo durante 96-144 horas con LACE a una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$. Cada dos días se renovó el medio de cultivo de estas células y se añadió nuevo LACE. Después de este período se realizó recuento celular previa tinción con Trypan Blue en una cámara de Neubauer. Los resultados son representados en la **Figura 14** en un diagrama de barras y en la **tabla 7**, donde se muestran los porcentajes de proliferación de las distintas líneas celulares. Debemos destacar las líneas celulares AGS, IMINPC1, MDA MB-231, ANDO2 y JURKAT donde la inhibición alcanza el 100% respecto al control. El porcentaje de inhibición en las otras líneas estudiadas ronda entre un 71% (fibrosarcoma murino B9) a un 98% (adenocarcinoma humano A549), con la excepción de la línea leucémica U937 donde se obtiene sólo un 21% (**Figura 14**). Debemos señalar que la línea celular U937 presenta una tasa de proliferación muy alta en condiciones normales, doblándose el número de células en menos de 12 horas. LACE induce sobre la línea NKL, dependiente de IL-2, un aumento de proliferación respecto al control, siendo el porcentaje de proliferación de un 85% respecto al obtenido con IL-2.

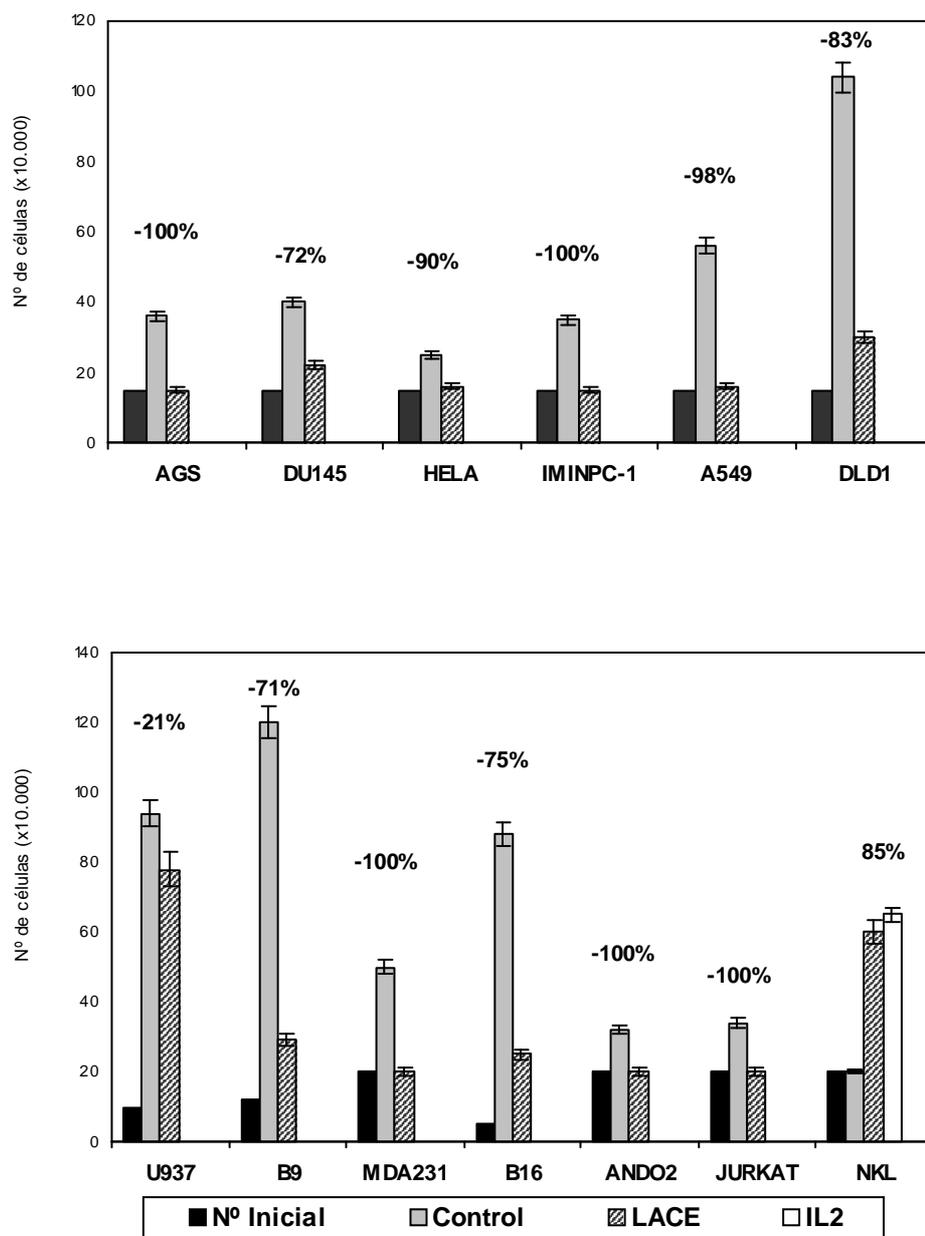


Figura 14

	Nº células. ($\times 10^4$)				PROLIFERACION
	INICIAL	CONTROL	TRATADAS		
B16	25	440	120	25%	
B9	12	120	29	29%	
MDAMB 231	20	50	20	0%	
ANDO 2	20	32	20	0%	
AGS	15	36	15	0%	
DU 145	15	40	22	28%	
HELA	15	25	16	10%	
IMIN PC1	15	35	15	0%	
A549	16	56	16	0%	
DLD1	15	104	30	17%	
U937	10	94	78	79%	
JURKAT	20	34	20	0%	

Tabla 7

Figura 14 y Tabla 7. Varias líneas celulares tumorales fueron cultivadas en un número inicial de $1.5-2.5 \times 10^5$ en presencia o ausencia de LACE a una concentración de $250 \mu\text{g/ml}$ durante 4-6 días. Después de este período la células viables fueron contadas con trypan blue. El porcentaje de células viables fue calculado usando la ecuación: $(\text{número células}_{\text{tratadas}} - \text{número células}_{\text{inicial}}) / (\text{número células}_{\text{control}} - \text{número células}_{\text{inicial}}) \times 100$.

Para determinar si la actividad antiproliferativa *in vitro* se mantenía en el tiempo, la línea tumoral AGS fue tratada con $250 \mu\text{g/ml}$ de LACE durante 20 días y con 1 mg/ml de LACE durante 40 días, al cabo de los cuales se realizó recuento celular con Trypan Blue. Cada dos días se cambió el medio de cultivo y se añadió nuevo LACE. Los resultados muestran una inhibición mantenida del crecimiento celular tanto a los 20 días como a los 40 días (**Tabla 8**). La proliferación obtenida, si la comparamos al control, es de un 11% en el caso de las células tratadas con $250 \mu\text{g/ml}$ y de 1.6% cuando se cultivaron con 1 mg/ml (**Tabla 8**).

$$\begin{array}{l}
 \text{N}^\circ \text{ células inicial:} \\
 20 (x10^4)
 \end{array}
 \left\{
 \begin{array}{l}
 \bullet \text{ Control, 20 días: } 330 (x10^4) \\
 \bullet \text{ LACE } 250 \mu\text{g/ml, 20 días: } 54 (x10^4) \Rightarrow 11\% \text{ proliferación} \\
 \bullet \text{ LACE } 1 \text{ mg/ml, 40 días: } 25 (x10^4) \Rightarrow 1.6\% \text{ proliferación}
 \end{array}
 \right.$$

Tabla 8. Estudio del efecto de LACE a largo plazo, sobre el carcinoma gástrico AGS, tras ser cultivado durante 20 días con 250 $\mu\text{g/ml}$ de LACE y durante 40 días con 1 mg/ml de LACE. El recuento celular se realizó con Trypan Blue. El porcentaje de células viables fue calculado usando la ecuación: $(\text{número células}_{\text{tratadas}} - \text{número células}_{\text{inicial}}) / (\text{número células}_{\text{control}} - \text{número células}_{\text{inicial}}) \times 100$.

5.- Estudio de las fases del ciclo celular en células tumorales

Para estudiar los mecanismos de la actividad antiproliferativa de este extracto, se analizaron en primer lugar los efectos en la distribución de las fases del ciclo celular por citometría de flujo. En la **Figura 15** se muestran, las distintas fases del ciclo celular de la línea tumoral humana AGS, derivada de un carcinoma gástrico, cuando se cultiva *in vitro* sin LACE: un 28.66% de las células se encuentran en fase S, un 17.67% en fase G_2/M y un 34.68% en la fase G_0/G_1 . En contraste, cuando esta línea celular se trata con LACE a una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ durante 4 días se presenta una inhibición de la proliferación del 100% respecto al control y esto se traduce en una acumulación de las células en la fase G_0/G_1 (52.93%) a expensas de la fase S (**Figura 15**). Resultados similares se obtuvieron con la línea leucémica JURKAT, donde se encontraron en el caso del control unos porcentajes de 30.59% de las células en fase S, un 6.6% en fase G_2/M y un 26.7% en la fase G_0/G_1 . Al cultivarse esta línea con LACE los porcentajes obtenidos son: de un 1.42% en fase G_2/M y un 71.45% en la fase G_0/G_1 y de un 0% en fase S (**Figura 15**). En el caso de la línea A549 no tratada con LACE se observó unos porcentajes de: 29.55% de las células en fase S, un 13.43% en

fase G₂/M y un 32.13% en la fase G₀/G₁; al tratarse estas células con 250 µg/ml se observó un ligero incremento del porcentaje de células en fase G₀/G₁, siendo los porcentajes de: 28.09% de las células en fase S, 12.03% en fase G₂/M y 40.38% en la fase G₀/G₁. Al cultivarse esta línea con 1 mg/ml de LACE el acúmulo de células en la fase G₀/G₁ fue mayor que el encontrado con 250 µg/ml siendo los porcentajes de distribución del ciclo celular de: 3.4% de las células en fase S, un 4.43% en fase G₂/M y un 44.46% en la fase G₀/G₁ (**Figura 15**). En la **Tabla 9** se muestran los porcentajes de las fases del ciclo celular de las distintas líneas tumorales tratadas o no con LACE. Estos resultados nos indican una correlación entre los porcentajes de inhibición del crecimiento y la parada o ralentización del ciclo celular.

	MUERTAS	G ₂ /M	S	G ₀ /G ₁
AGS control	5.77%	17.67%	28.66%	34.68%
AGS LACE 250 µg/ml	12.24%	16.69%	0%	52.93%
A549 control	9.35%	13.43%	29.55%	32.13%
A549 LACE 250 µg/ml	8.94%	12.03%	28.09%	40.38%
A549 LACE 1mg/ml	29.07%	4.43%	3.40%	44.46%
JURKAT control	22.45%	6.60%	30.59%	26.70%
JURKAT 250µg/ml	11.61%	1.42%	0%	71.45%
HELA control	6.59%	14.24%	19.05%	48.58%
HELA LACE 250 µg/ml	14.77%	9.34%	15.31%	52.19%
B16 control	18.42%	6.13%	27.57%	33.84%
B16 LACE 250 µg/ml	10.98%	6.21%	4.57%	57.46%

Tabla 9. Se representan los porcentajes de células en distintas fases del ciclo celular después de cultivarse en presencia o ausencia de LACE durante 96 h a unas concentraciones de: 250 µg/ml y 1 mg/ml.

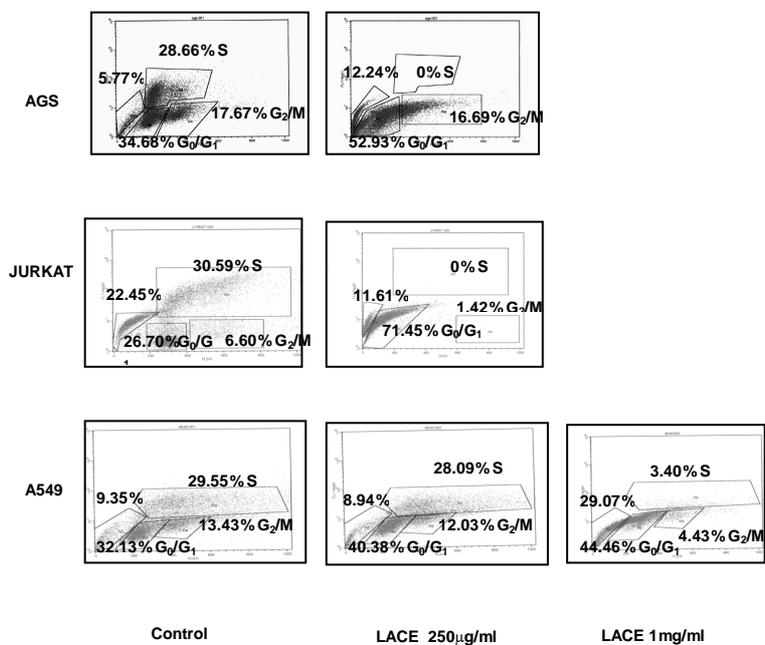
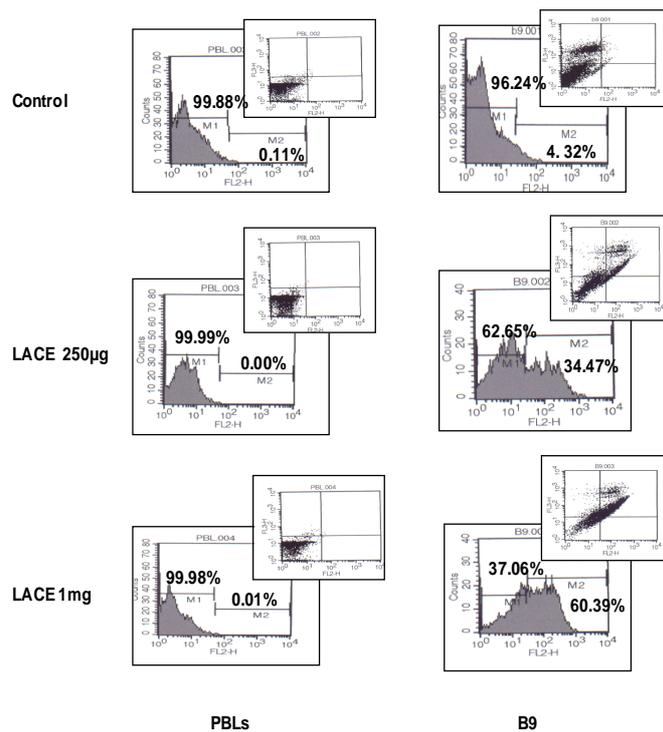


Figura 15. Análisis del ciclo celular de líneas tumorales humanas: AGS carcinoma gástrico, JURKAT leucemia linfática T, A549 carcinoma de pulmón. Después de cultivarse durante 96 h con LACE, las células son marcadas y analizadas por citometría de flujo. Los datos indican el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Los resultados mostrados son de un ensayo representativo de los tres realizados.

6.- Identificación de apoptosis con Anexina V

El tratamiento de células tumorales con LACE genera una subpoblación por debajo de G₁ sugiriendo células en apoptosis. Para analizar la capacidad del LACE de inducir apoptosis, las células tumorales B9 se trataron con 250 µg/ml y 1 mg/ml de LACE durante 4 días, cambiándose el extracto a los dos días. Después del tratamiento, se determinó la traslocación de la fosfatidilserina sobre la superficie de la célula durante la apoptosis usando el fosfolípido humano unido a la proteína, Anexina V, conjugado con el fluorocromo ficoeritrina (PE). Tanto las células no tratadas como las tratadas con LACE, se incubaron con Anexina V-PE y 7 amino-actinomicina D (7-AAD) y fueron analizadas por citometría de flujo. La apoptosis se analizó por cuadrantes estadísticos: Anexina V y 7-AAD negativas son células vivas, Anexina V positivas y 7-AAD negativas son células que inician la apoptosis, Anexina V negativas y 7-AAD positivas son células muertas pero no por apoptosis y Anexina V positivas y 7-AAD positivas indican que las células son realmente apoptóticas. El cultivo de las células B9 con el extracto a una concentración 250 µg/ml, indujo un incremento de la apoptosis de un 4.32% (células no tratadas) a un 34.47% (**Figura 16**). Cuando la línea tumoral B9 se cultiva con 1 mg/ml del extracto durante 4 días este porcentaje de apoptosis se incrementa a un 60.39% (**Figura 16**). Similares resultados nos encontramos en otras líneas tumorales estudiadas como la AGS (**Tabla 10**). PBLs tratados con LACE no muestran incremento de apoptosis respecto al control (**Figura 16**). En el caso de líneas donde no se produce una parada total del ciclo celular A549 o HeLa, con la concentración de 250 µg/ml también se observó un incremento de apoptosis respecto al control. De esta manera, en la línea HeLa el porcentaje de apoptosis pasó



	Control	LACE 250 µg/ml	LACE 1 mg/ml
B9	4.32%	34.47%	60.39%
HELA	11.26%	20.32%	56.74%
A549	13.41%	28.84%	36.40%
AGS	20.46%	43%	60%
JURKAT	6%	10.71%	48.3%

Figura 16 y Tabla 10. Análisis de apoptosis por Anexina V. PBLs humanos y el fibrosarcoma murino B9, fueron cultivados en ausencia o presencia de 250 µg/ml o 1 mg/ml de LACE durante 96 horas. En la **Tabla 10** se muestran los porcentajes de células apoptóticas de distintas líneas celulares. Todos los ensayos se han realizado por triplicado obteniéndose resultados similares, mostrándose un ensayo representativo

de ser un 11.26% a un 20.32% cuando las células se tratan, y en la línea A549 el porcentaje pasó de un 13.41% a un 28.84% cuando se cultiva con LACE (**Figura 16 y Tabla 10**). Cuando estas dos líneas fueron tratadas con 1 mg/ml de LACE, la apoptosis se incrementa respecto al control, pasando en el caso de la HeLa de un 11.26% (control) a un 56.74% y en el caso de la A549 de un 13.41%(control) a un 36.40% (**Figura 16**).

7.- Análisis de expresión de caspasa 3

Las caspasas son las principales enzimas involucradas en el proceso apoptótico. Así, se midió la expresión de caspasa-3, que a su vez activa otras caspasas, en las células tratadas con LACE mediante citometría de flujo. Se trataron PBLs y distintas células tumorales con el extracto durante 96 horas. Para la línea AGS los resultados ilustran que las células no tratadas son prácticamente negativas para caspasa-3 (5.37%), mientras que se detecta un 39.41% de células con actividad caspasa-3 cuando son cultivadas con 250 $\mu\text{g/ml}$ LACE durante 4 días y un 42.22% cuando se trataron con 1 mg/ml (**Figura 17**). Por el contrario, en otras líneas tumorales estudiadas, como la A549, HeLa o B9 la expresión de caspasa-3 no aumentó con el tratamiento con LACE. Estos resultados nos indican que la apoptosis en estas células no está inducida por caspasa-3. Las líneas tumorales A549 y HeLa se cultivaron en presencia de taxol a una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ durante 96 horas, observándose un aumento de la expresión de caspasa-3 en relación al control, siendo los porcentajes de expresión de un 75.14% y un 57.01% respectivamente (**Figura 17**). Como control se utilizaron PBLs y como era de esperar, este extracto utilizado a la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ y de 1 mg/ml no indujo expresión de caspasa-3 (**Figura 17**).

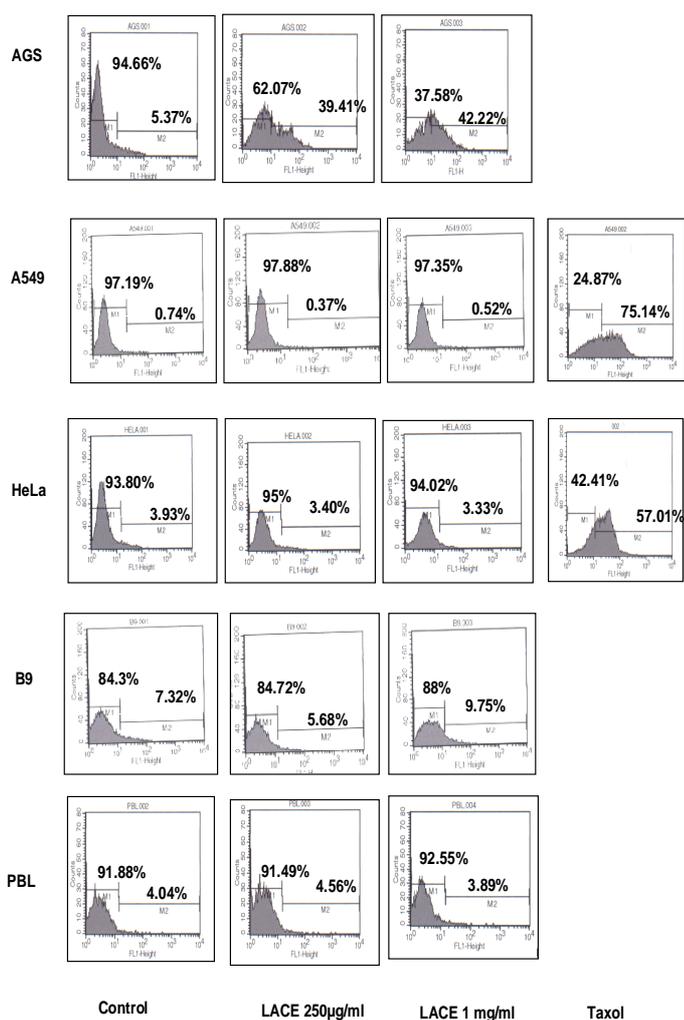


Figura 17. Análisis por citometría de flujo de apoptosis usando el anticuerpo anti-caspasa-3. PBLs y las líneas tumorales: AGS, A549, HeLa y B9 fueron cultivados en ausencia o presencia de 250 µg/ml o 1 mg/ml de LACE durante 96 h. Las líneas A549 y HeLa fueron tratadas también con taxol. Las células fueron permeabilizadas, fijadas y marcadas con el anticuerpo anti-caspasa-3. Los datos indican el porcentaje de células positivas para la expresión caspasa-3 (células apoptóticas). Los datos son representativos de tres ensayos independientes

8.- Análisis de proteínas implicadas en el ciclo celular

Como se ha visto anteriormente, LACE produce la parada del ciclo celular y la acumulación de células en la fase G_0/G_1 . A continuación, se determinó el papel desempeñado por diferentes proteínas implicadas en el ciclo celular. El estudio de estas proteínas se realizó mediante inmunofluorescencia directa, Western-Blot y ELISA. Para realizar los ensayos se utilizaron las líneas tumorales AGS y JURKAT tratadas durante 96-144 horas con 250 $\mu\text{g/ml}$ de LACE.

La expresión de las ciclinas D1 y E se midió por citometría de flujo tanto en células tratadas o no con LACE. Estas ciclinas intervienen regulando el punto de control G_1/S . Como se muestra en la **Figura 18** la línea JURKAT cultivada en ausencia de LACE presenta una expresión de ciclina D1 y E siendo los porcentajes de 36.41% y 87.44% respectivamente. Al cultivarse estas células con el extracto, los porcentajes de ambas ciclinas se reducen a un 0.88% para la ciclina D1 y a un 22.09% para la ciclina E (**Figura 18**). Estos resultados son semejantes a los encontrados cuando se cultiva la línea AGS con LACE, donde la expresión de la ciclina D1 se reduce de un 34.56% a un 4.11% y la de la ciclina E pasa de ser de 72.01% en las células no tratadas a un 2.01% en las células cultivadas con LACE (**Figura 18**).

En el caso de las ciclinas D3, B y A el análisis fue realizado por Western-Blot, observándose una disminución significativa de la expresión de las ciclinas D3 y A en las células tratadas con LACE (**Figura 19**). La expresión de la ciclina B no experimentó cambios en las células tratadas con LACE (**Figura 19**). El papel de las ciclinas D, E y A es regular el paso de las células a través de la fase S, mientras que la ciclina B es un regulador crítico de la mitosis.

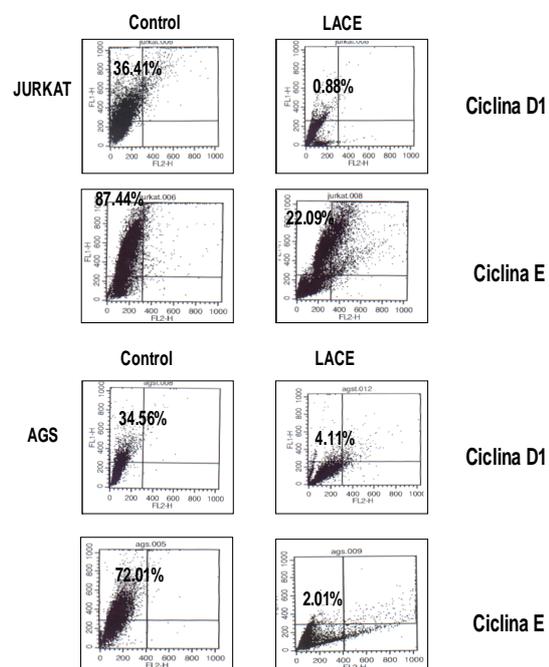


Figura 18. Análisis de la expresión de ciclina D1 y E, en las líneas tumorales JURKAT y AGS, tras ser cultivadas durante 96-144 horas con o sin 250 µg/ml de LACE. Los porcentajes representan las células positivas para la ciclina D1 y E, de un ensayo representativo de los tres realizados

El estudio de ciclinas dependientes de kinasas (CDKs), CDK2, CDK4, CDK1/Cdc2 por Western-Blot reveló una menor expresión en las células tratadas con LACE (**Figura 19**). Estas proteínas están implicadas en la regulación de la fase G_0/G_1 y su activación es necesaria para la progresión de las células a la fase S. Del mismo modo, las proteínas de retinoblastoma Rb, Rb2, RBBP (retinoblastoma-binding protein) y PCNA (proliferating cell nuclear antigen) presentan una expresión inferior en células tratadas con LACE respecto a las células controles (**Figura 19**). Las proteínas p19 y p36 no muestran diferencias entre las células tratadas y no tratadas con LACE. La proteína p19 juega un papel esencial en los complejos kinasas de la fase S y la p36, es una proteína de 36 KDa que funciona como una kinasa que activa Cdk (**Figura 19**). Los niveles más elevados de PCNA se presentan durante la fase S siendo indetectable en otras fases del ciclo. La proteína Rb durante la fase G_1 está en estado hipofosforilado e interactúa con un gran número de proteínas nucleares incluyendo factores transcripcionales E2F, varias ciclinas, RBP-1, RBP-2, RBBP, c-myc, N-myc y p46. Para que la célula pueda entrar en la fase S se necesita la fosforilación de Rb y de esta manera se libera los factores E2F o DP1 necesarios para la expresión de genes implicados en la fase S. El Rb identificado mediante esta técnica es el Rb total, tanto fosforilado como hipofosforilado, así para poder identificar el Rb hipofosforilado o unido al DNA que es el que bloquea a las células en la fase G_0/G_1 se realizó un ensayo de factores transcripcionales mediante ELISA. En este ensayo se muestra un aumento de los niveles de Rb en las células tratadas con LACE respecto al control y un descenso de los factores DP-1, E2F-1, E2F-2 en las líneas AGS y JURKAT tratadas (**Figura 20**).

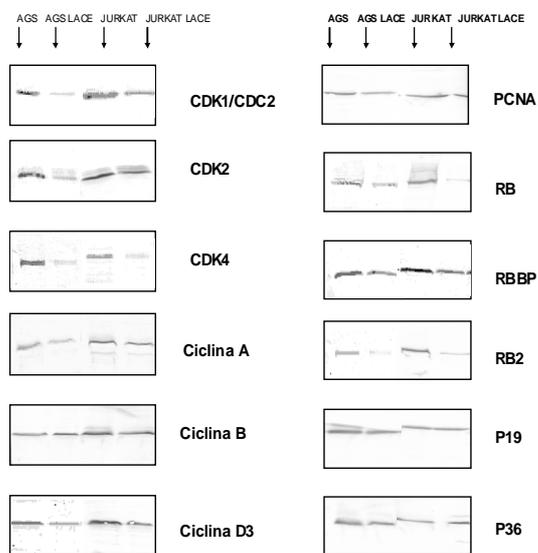


Figura 19. Análisis por Western-Blot de la expresión de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular: CDK1/Cdc2, CDK2, CDK4, ciclina A, ciclina B y ciclina D3, PCNA, Rb, Rb2, RBBP, p19 y p36. Se emplean las líneas tumorales AGS y JURKAT cultivadas en presencia o ausencia de LACE durante 96-144 horas. En la figura se muestran los resultados de un ensayo representativo de los tres realizados

En esta figura también se muestran las absorbancias obtenidas de p107, una proteína de la familia del Rb, observándose un aumento de la misma en las células cultivadas con el extracto (**Figura 20**).

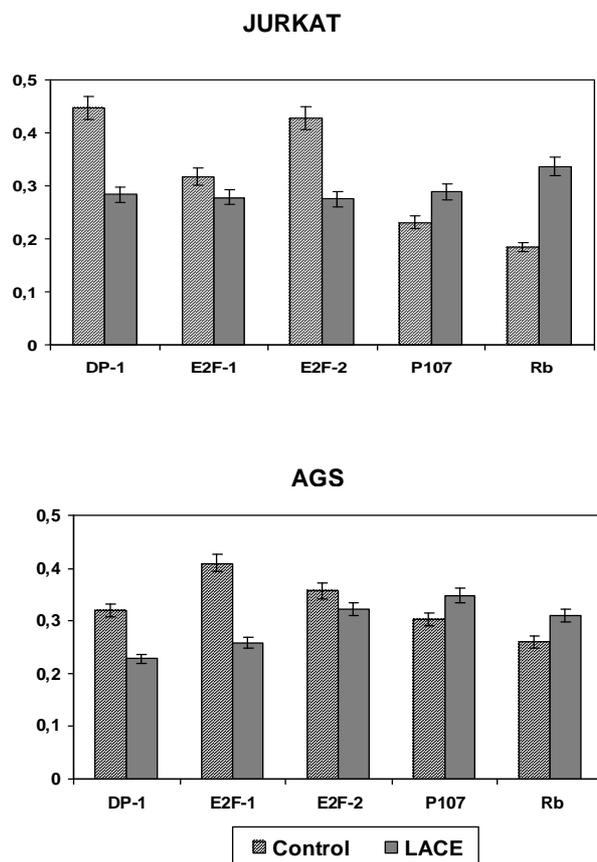


Figura 20. Absorbancias obtenidas por un ensayo de ELISA de factores transcripcionales implicados en el control del ciclo celular: DP-1, E2F-1, E2F-2, factor p107 y el retinoblastoma (Rb). Se comparan las células tratadas con LACE con las células control, en las líneas tumorales JURKAT y AGS. Cada columna representa la media de tres ensayos independientes \pm SD

9.- Ensayo de seguridad en ratones con LACE

Una vez realizados los ensayos *in vitro* y analizadas las actividades biológicas, nos planteamos el estudio de toxicidad *in vivo* de LACE, administrando oralmente este producto a ratones de distintas cepas y a ratas.

En el ensayo de seguridad biológica con ratones Balb/c los resultados muestran que con las concentraciones de LACE de 55 mg/kg peso, 11 mg/kg de peso y en el grupo control (administración oral del mismo volumen de agua) no se produce ningún éxitus a lo largo de los 30 días que dura el ensayo (**Figura 21**). Cuando se administra una concentración de LACE de 550 mg/kg peso mueren el 50% de los ratones (dosis letal 50) a los 15 días de iniciar el ensayo. Con la concentración de 2.750 mg/kg peso mueren el 80% de los animales a los 20 días y el 20% restante sobrevivió hasta terminar el ensayo (**Figura 21**). Este ensayo se repitió 3 veces con unos resultados similares, mostrándose un ensayo representativo en la **Figura 21**.

Cuando se realizan estos ensayos en otras cepas de ratones, CBA y C57/BL6 los resultados fueron muy similares a los encontrados en ratones de la cepa Balb/c (**Figura 21**). Como se puede observar, los resultados de los ensayos de seguridad biológica, son muy similares en las 3 cepas de ratones (Balb/c, CBA, C57/BL6), no presentándose diferencias significativas y coincidiendo en una misma dosis letal 50 (DL50), de 550 mg/kg de peso.

10.- Ensayo de seguridad en ratas

En el ensayo de seguridad con ratas Wistar, se observa que el grupo control y los grupos a los que se les administra diariamente una dosis de LACE de 55 y de 550 mg/kg de peso, no presentan ningún éxitus (**Figura 21**). Sin embargo, en el grupo de ratas al que se le da la dosis de LACE de 2.750 mg/kg de peso se producen 6 éxitus (60% del grupo) a los 15 días, manteniéndose las 4 ratas restantes vivas hasta finalizar el ensayo (**Figura 21**). Este ensayo se repitió 3 veces con unos resultados similares, mostrándose un ensayo representativo.

En los estudios de toxicidad aguda en ratas, a diferencia de los ensayos en ratones, la DL 50 es de 2.750 mg/kg de peso no produciéndose ninguna muerte con las dosis inferiores. Se realizaron necropsias en los animales muertos, y el informe indicó que el órgano principal afectado era el hígado con presencia de necrosis hepática.

Las ratas y ratones que sobrevivieron una vez acabados los ensayos de toxicidad aguda (30 días de administración de LACE en días alternos), se mantuvieron durante 90 días más para evaluar los efectos tóxicos tardíos después de la administración del producto. En este período de tiempo no se observó ningún éxitus ni alteraciones físicas o de comportamiento en los animales.

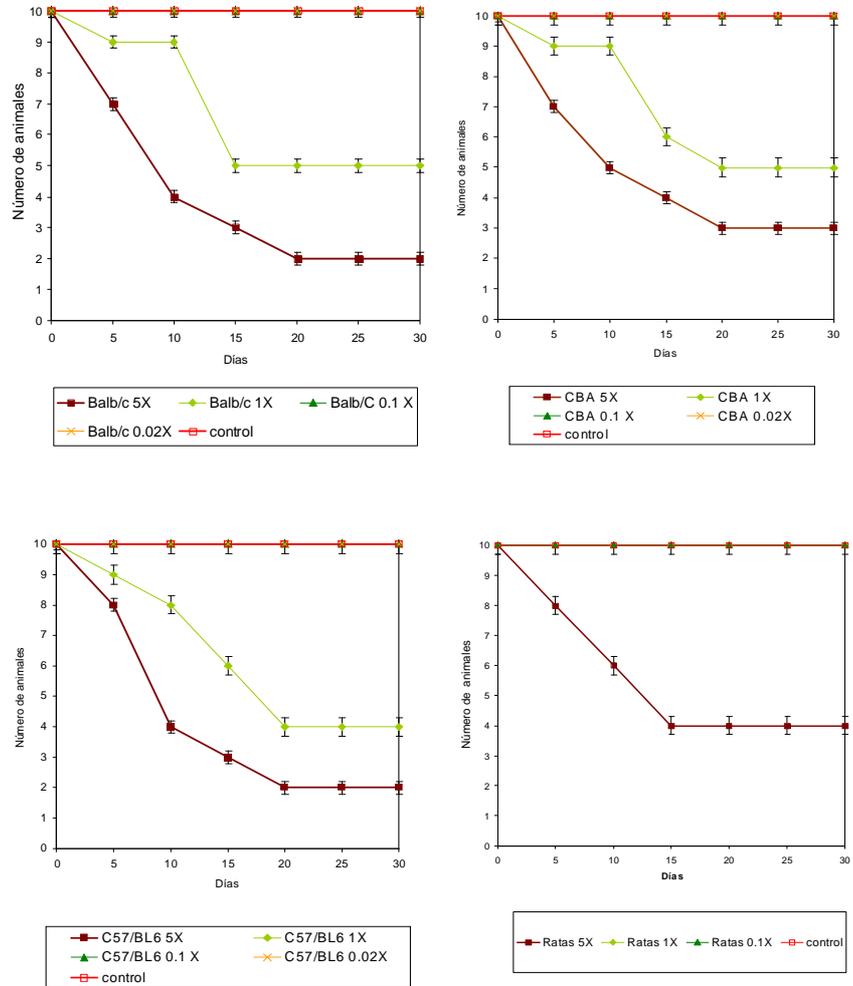


Figura 21. Estudio de toxicidad *in vivo* de LACE en ratones BALB/c, CBA, C57/BL6 y en ratas Wistar a los que se les administra diariamente LACE por vía oral durante 30 días. Se establecen 4 grupos de 10 ratones cada uno a los que se les administra 4 concentraciones distintas del extracto.

11.- Análisis *in vivo* de subpoblaciones de linfocitos de ratones

Para evaluar el efecto mitogénico de LACE *in vivo*, se administró LACE a ratones vía oral o intraperitoneal de 1 a 4 semanas y se analizaron las diferentes subpoblaciones linfocitarias, por citometría de flujo. La sangre total de ratones tratados y no con LACE se incubó con anticuerpos monoclonales: antiCD4, antiCD3, antiCD23, antiCD45, PANK y con el marcador de activación CD69. En el grupo de ratones control, los porcentajes de subpoblaciones encontradas fueron: 50.13% CD23+, 18.28% CD23+/CD69, 9.82% CD4+/CD69+, 24.60% CD4+, 25.9% PANK, 6.96 CD3+/PANK y 2.91% CD23+/IgM+ (**Figura 22**). Cuando los ratones son tratados con LACE vía oral se produce un incremento significativo de células CD23, CD4, PANNK y PANKT en relación al grupo control con porcentajes de 73.40% CD23+, 22.05% CD23+/CD69, 15.12% CD4+/CD69+, 32.30% CD4+, 31.89% PANK y 9.74% CD3+/PANK (**Figura 22**). Los ratones tratados con LACE vía intraperitoneal presentan un aumento de linfocitos CD3+/PANNK (8.24%) y de CD23+/IgM+ (8.32%) respecto al grupo control. Hay que destacar que el aumento de CD4+ y de linfocitos NKT, se produce a las 4 semanas de administrar LACE a los ratones. El grupo de ratones tratados con taxol, muestra unos porcentajes de subpoblaciones algo inferiores a los del control: 31.83% CD23+, 16.68% CD23+/CD69, 11.57% CD4+/CD69, 26.59% CD4+, 5.44% CD3+/PANK y 1.91% CD3+/IgM+. De esta manera, el análisis de subpoblaciones indica que las células en proliferación cuando se administra LACE a los ratones son principalmente: linfocitos B, linfocitos T CD4+ y células NKT.

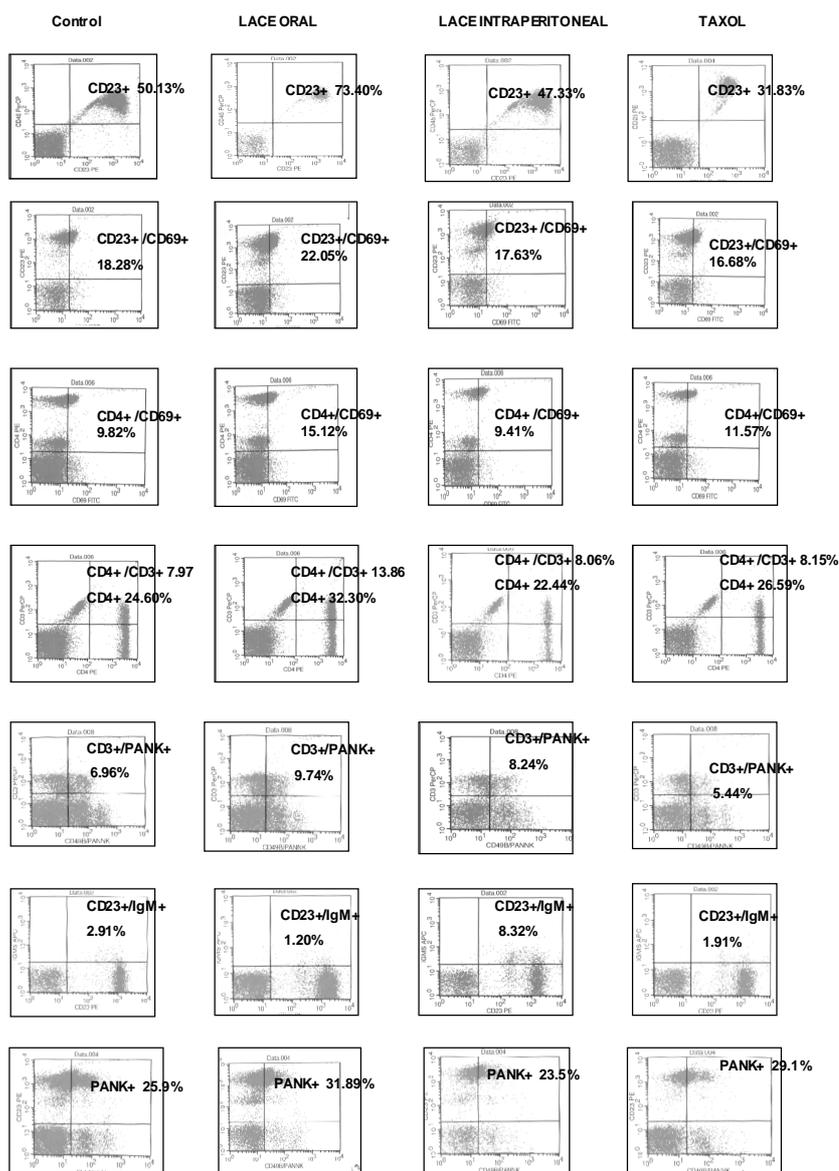


Figura 22. Análisis por citometría de flujo de subpoblaciones y activación linfocitaria. Ratones Balb/c se trataron de 1 a 4 semanas con LACE y los linfocitos son incubados con los anticuerpos monoclonales: CD23, CD45, CD69, PANK, CD4 y CD3. Los porcentajes indican las células positivas para cada uno de los anticuerpos empleados. Los datos son representativos de tres ensayos independientes

12.- Ensayo de crecimiento local en ratones inmunocompetentes

Después de conocer las actividades biológica *in vitro* y comprobar la no toxicidad a dosis terapéuticas *in vivo*, se realizaron ensayos de crecimiento local *in vivo* en ratones a los que se les administra LACE para conocer su actividad antitumoral. Se inyectaron subcutáneamente en la pata células del melanoma murino B16 (5×10^5 células/ratón). Se hicieron seis grupos distintos con 10 ratones cada uno: control, control oral, control intraperitoneal, administración oral de LACE (50 mg/kg de peso), administración intraperitoneal de LACE (25 mg/kg de peso) y administración intraperitoneal de taxol. Este último nos servirá para comparar los resultados con los obtenidos con LACE. Tanto el extracto de caléndula como el taxol se comenzaron a administrar un día después de la inyección de las células tumorales. El crecimiento tumoral fue controlado tres veces a la semana observándose crecimiento 13 días después de la inyección de las células tumorales. Se realizaron tres ensayos con estas características, representándose en la **Figura 23** las medias de los valores de crecimiento tumoral obtenidos en cada grupo, considerando el día 1 el primer día que se observó crecimiento en la pata de los ratones. Los resultados fueron similares en los tres grupos controles representándose en la figura uno de ellos. Si consideramos por lo tanto, el 100% de crecimiento tumoral las medias obtenidas cada día en el grupo control, podemos mostrar que los ratones a los que se les administra LACE vía oral presentan unas medias inferiores al control, equivalentes a una inhibición del crecimiento tumoral entre un 7%, en el primer día que se observa crecimiento tumoral, hasta el 35%. Los porcentajes de inhibición más elevados, en torno a un 35%, se

alcanzan entre los días 3 a 9, siendo al final del estudio el porcentaje de inhibición de un 10% aproximadamente. Cuando se administra LACE vía intraperitoneal, se observa un menor tamaño tumoral desde el día 1, presentándose una inhibición de un 38.7%. Al final del estudio se muestran unos valores que representan un 44.4% de inhibición respecto al control. Los ratones tratados con taxol, presentan un menor tamaño tumoral desde el día 1 que se observa crecimiento del tumor, con unos porcentajes de inhibición de un 24.6% a un 23% entre los días 1 y 5. Esta inhibición de la proliferación es menos acusada en el día 7 y 13, donde sólo se observa un 5.5% y un 3.98% de inhibición respectivamente respecto al control.

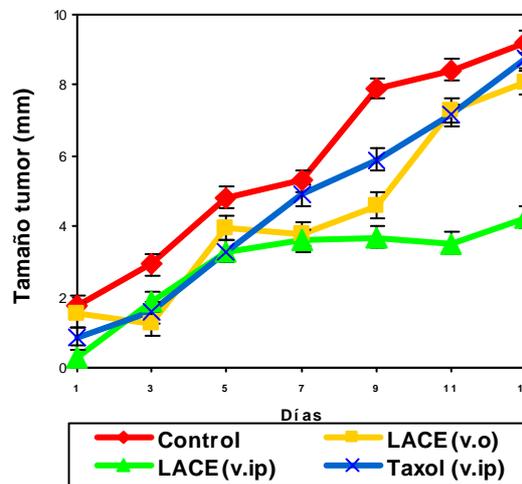


Figura 23. Estudio de crecimiento tumoral *in vivo* en ratones C57/BL6 del melanoma B16. Se establecen los siguientes grupos de animales: controles, administración oral de LACE, administración intraperitoneal de LACE y administración intraperitoneal de taxol. Los tres grupos controles dan resultados similares representándose uno de ellos. Se muestra el diámetro tumoral mayor en la pata tras la inyección del melanoma murino B16 y se considera el día 1, el primer día que se observa crecimiento del tumor. Cada punto representa la media de al menos 3 ensayos realizados independientes \pm SD

13.- Ensayo de crecimiento local en ratones atímicos

Para evaluar el efecto *in vivo* en la proliferación de líneas tumorales humanas se inyectaron subcutáneamente en la pata de ratones atímicos, células del melanoma humano ANDO-2 (5×10^6 células/ratón). Se hicieron seis grupos distintos con 10 ratones cada uno: control, control oral, control intraperitoneal, administración oral de LACE (50 mg/kg peso), administración intraperitoneal de LACE (25 mg/kg peso) y administración intraperitoneal de taxol (5 mg/kg peso). Tanto el extracto de caléndula como el taxol o el suero fisiológico se comenzaron a administrar el mismo día de la inyección de las células tumorales. El crecimiento tumoral fue controlado con la medición del diámetro tumoral tres veces a la semana. Los tumores empezaron a crecer el día 17 después de la inyección de las células tumorales. En la **Figura 24** se representan las medias de los valores del diámetro tumoral mayor obtenido en cada grupo, desde el día 27 hasta el día 131. Como control, se representan las medidas de uno de los controles, ya que no se observaron diferencias entre ellos. Considerando el 100% de crecimiento tumoral las medias obtenidas cada día en el grupo control, en la **Tabla 11** se muestran los porcentajes de inhibición encontrados referidos a dicho grupo. Al inicio del ensayo, como se puede observar en la figura, no existen diferencias significativas entre las medias de los cuatro grupos, pero a partir del día 49 se observa un 10.05% de inhibición en el grupo de LACE oral, un 19.6% en el grupo de LACE intraperitoneal y un 15.73% en el grupo de taxol. En el caso de ratones a los que se les administra LACE vía oral el crecimiento tumoral es menor respecto al control, rondando entre un 10% hasta un 59% de inhibición, consiguiéndose los porcentajes de inhibición más elevados (59% - 50.3%) entre los días 79 y 118 y

siendo al final del ensayo, en el día 131, el porcentaje de inhibición de un 38%. Cuando se administra LACE vía intraperitoneal, también se observa un crecimiento tumoral inferior respecto al control, desde el día 49 donde se encuentra un 19.6% de inhibición hasta el día 131 donde la inhibición alcanza un 28%. Los porcentajes de inhibición más elevados (58.5% a 61.5%) se presentan entre los días 79 al 91. En el caso de la administración de taxol vía intraperitoneal, los valores de crecimiento tumoral son inferiores al control, presentándose una inhibición de la proliferación desde un 15.73% en el día 49 hasta hasta un 59% en el día 84. Esta disminución del crecimiento se mantiene hasta el final del ensayo, donde existe una inhibición del crecimiento de un 34.21%. En la **Figura 24** se puede observar que el tamaño del tumor en el grupo control, comienza a dispararse alrededor del día 49, mientras que en el caso de los grupos de ratones tratados con LACE vía oral, vía intraperitoneal o taxol, el crecimiento es más lento, comenzando a aumentar en torno al día 90. Hay que destacar que a partir del día 70 se dejó de administrar LACE vía intraperitoneal y en el día 90 se suspendió la administración de LACE vía oral, coincidiendo de esta manera la suspensión de LACE con el aumento acelerado del crecimiento tumoral en estos grupos.

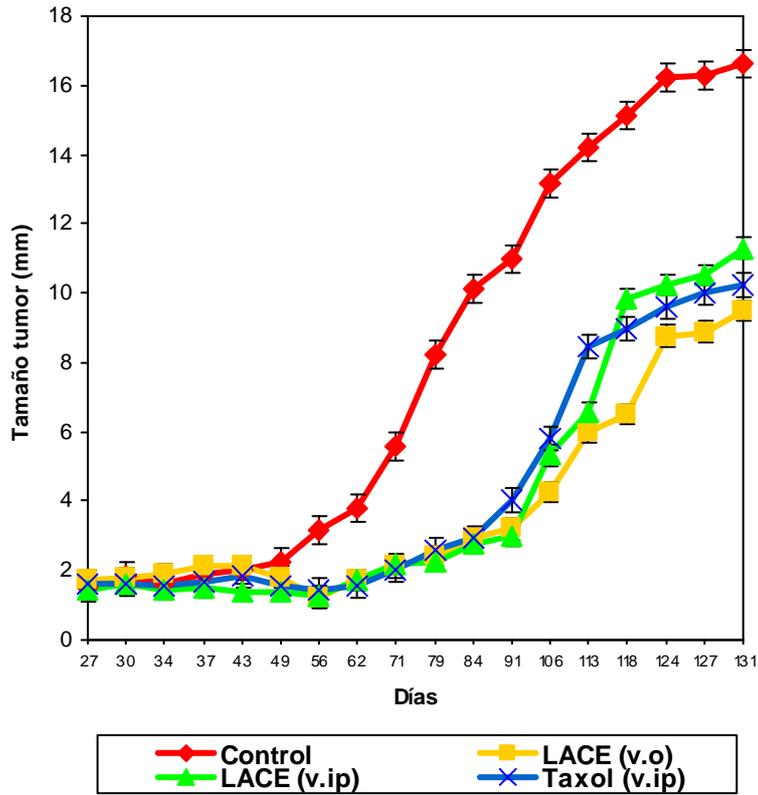


Figura 24. Análisis del crecimiento tumoral *in vivo* en ratones atímicos. Se establecen cuatro grupos de animales: control, administración oral de LACE, administración intraperitoneal de LACE y administración intraperitoneal de taxol. Se representa el crecimiento tumoral medido en la pata, tras administrar 5×10^6 células del melanoma humano ANDO-2, desde el día 27 hasta el día 131. Cada columna representa la media de al menos 3 ensayos realizados independientemente \pm SD

Días	Oral	I.P	Taxol
49	10.05	19.6	15.73
56	37.8	37.08	33
62	35.8	35.5	38.9
71	45.9	44.8	47
79	56.9	58.5	55
84	59.3	60.49	59.1
91	60	61.5	53.5
106	58.6	51.38	48.4
113	50.6	47.2	35.49
118	50.3	30.7	35.9
124	40.9	32.7	36.22
127	40.4	31.41	34.2
131	38.34	28.57	34.21

Tabla 11. Porcentajes de inhibición de crecimiento tumoral en ratones atímicos tratados con LACE vía oral, vía intraperitoneal y taxol. Se considera el 100% de crecimiento tumoral, la media del diámetro tumoral de los ratones del grupo control

En la **Figura 25** se muestran los porcentajes de supervivencia en cada grupo desde el inicio del ensayo hasta el día 135. Como se puede observar la supervivencia más alta se alcanza en el grupo oral, con un 75% de los animales vivos en el día 135, le sigue el grupo de ratones a los que se les administra LACE vía intraperitoneal con un 60% de supervivencia y los ratones a los que se les administra taxol con un 40%. En el día 135 el 100% de los animales del grupo control habían muerto. También hay que destacar que la primera mortalidad en el grupo

control se produce unos 25 días antes en comparación con el grupo oral e intraperitoneal. Así cuando ocurre la primera muerte en el grupo oral o en el intraperitoneal un 50% de los ratones del grupo control ya han fallecido.

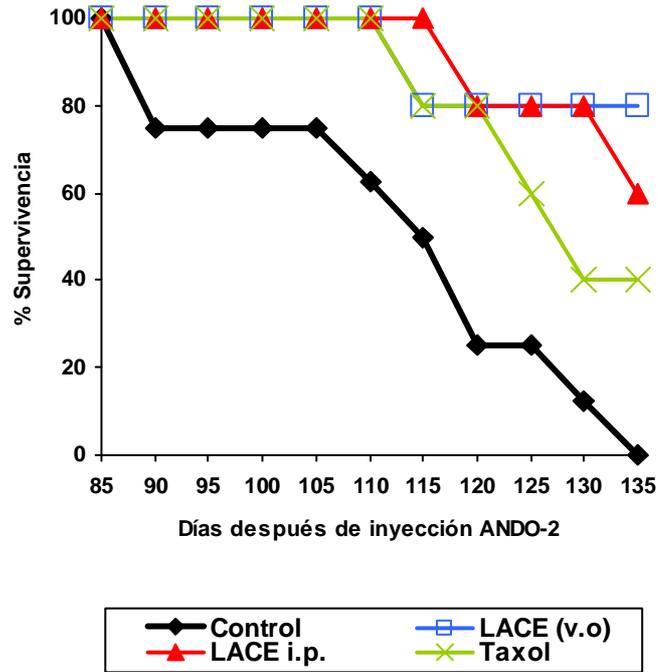


Figura 25. Porcentajes de supervivencia de ratones nude al cabo de 131 días de inyectar el melanoma humano ANDO-2. Se comparan los cuatro grupos: control, administración oral de LACE, administración intraperitoneal de LACE y administración intraperitoneal de taxol.

Discusión

Los tratamientos tumorales convencionales han mejorado sin cesar durante las últimas décadas, pero sigue siendo necesaria la búsqueda de estrategias terapéuticas suplementarias y complementarias. Los objetivos terapéuticos en oncología son aumentar la supervivencia de los pacientes y evitar o paliar los efectos adversos que deterioran su calidad de vida. Los abordajes más prometedores son el bloqueo de la neoangiogénesis, la modulación de las enzimas que degradan la matriz y los procedimientos inmunoterapéuticos dirigidos a antígenos tumorales diana definidos molecularmente. El tratamiento médico del cáncer del futuro debe asentarse sobre unas bases racionales del conocimiento de la proliferación, diferenciación y apoptosis.

En este contexto de búsqueda de nuevos métodos terapéuticos oncológicos situamos al extracto, LACE. LACE es un producto obtenido de la planta *Caléndula Officinalis*, muy común en todo el mundo. El proceso de extracción patentado (patente nº EP 1 339420 B1) es sencillo, estandarizado, reproducible y de bajo coste.

Diferentes extractos de caléndula han mostrado una amplia variedad de actividades biológicas: inmunoestimulante (Amirghofran y cols, 2000), antitumoral (Boucad-Maitre, 1988), antiinflamatoria (Akihisa y cols. 1996; Zitterl-Eslsler y cols, 1997; Sarrell y cols, 2001 y 2003), analgésica (Sarrell y cols, 2001 y 2003), antibacteriana, antioxidante (Córdova y cols, 2002), antiviral (Elie y cols, 2004), diurética, antidismenorreica, anti-VIH (Kalvatchev y cols, 1997) e incluso presenta propiedades antigenotóxicas (Pérez-Carreón y cols, 2002). Dentro de estas actividades y con el objetivo de buscar nuevos agentes antitumorales, nos hemos centrado en el estudio de LACE concretamente en su actividad citostática e inmunomoduladora.

En nuestro estudio hemos mostrado tras realizar una curva dosis-respuesta que LACE presenta *in vitro* una actividad citostática o de inhibición del crecimiento en un rango de 125 a 500 $\mu\text{g/ml}$, eligiéndose la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ para realizar nuestros estudios (**Figura 12**). Así se evaluó la actividad antitumoral en una amplia variedad de líneas tumorales tanto humanas como murinas derivadas de tumores sólidos de distinta estirpe celular o de leucemias. Algunas de estas líneas presentan una inhibición del 100% de su crecimiento cuando se tratan con LACE como es el caso de líneas tumorales humanas AGS carcinoma gástrico, IMINPC-1 adenocarcinoma de páncreas, JURKAT leucemia linfocítica T o ANDO-2 melanoma. Otras en cambio, alcanzan una inhibición que ronda entre un 70% a un 95% como las líneas: DU 145 (carcinoma de próstata), HeLa (carcinoma de cérvix), A549 (carcinoma de pulmón), B16 (melanoma murino) y B9 (fibrosarcoma murino). Es importante destacar que este efecto inhibitorio se presenta en las líneas celulares tumorales de diferentes tumores sólidos y de leucemias, no siendo específico de un tejido tumoral. La inhibición del crecimiento tumoral presentada con el extracto LACE fue similar a la encontrada con taxol en algunas de las líneas tumorales estudiadas (**Figura 13**).

El tratamiento de la caléndula con láser es necesario para inducir esta actividad inhibitoria, ya que un extracto similar de caléndula sin someterse a radiación con láser CE, induce una inhibición del crecimiento de células tumorales bastante inferior que con LACE (**Figura 12 b**).

Como excepciones tenemos las líneas U937 (leucemia monoclónica), donde se obtiene un 21% de inhibición y la línea NKL (Robertson, 1996) que experimenta un incremento de su proliferación respecto al control (**Figura 14 y Tabla 7**). La línea

U937 presenta una replicación muy alta, duplicándose el número de células en menos de 12 horas. Por otra parte, la línea NKL no crece por sí sola, como todas las anteriores, sino que necesita de IL-2 para su crecimiento. El porcentaje de crecimiento que sufre la línea NKL en presencia de LACE es muy similar al que se produce con IL-2 (**Figura 14**). Este mismo efecto ha sido encontrado *in vitro* por otro polisacárido aislado del hongo *Coriolus Versicolor*, PSK (Pedrinaci y cols, 1999). PSK ha mostrado una actividad antitumoral *in vitro* y en ensayos clínicos en humanos, donde se han encontrado buenos resultados como agente adyuvante en la terapia del cáncer, con resultados positivos en el tratamiento del cáncer de estómago, esófago, colon, pulmón y mama (Kudo y cols, 2002; Munemoto, 2002 y 2004; Ohwada y cols, 2004). Se cree que puede actuar de diferentes maneras inhibiendo la carcinogénesis al inhibir la acción de varios carcinógenos en las líneas celulares vulnerables (Fisher y cols, 2002). La acción antimetastásica se ha mostrado que es debida a su potencial para inhibir las metaloproteinasas y otras enzimas involucradas en las metástasis (Fisher y cols, 2002) y por su actividad inmunomoduladora por activación de las células NK (Algarra y cols, 1997 y 1999, García-Lora, 2003).

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se ha mostrado que la ruta de transducción de señales en las células NKL implicada en la respuesta a IL-2 o PSK es diferente, a nivel de la expresión de PKC α (Protein kinasa C α) y de otras isoenzimas (García-Lora, 2001 y 2003). En el último trabajo realizado por nuestro grupo (Jiménez-Medina y cols, 2005) hemos mostrado que PSK interactúa *in vitro* con un receptor de la NKL de aproximadamente 48 Kd, mientras que el receptor utilizado por IL-2 en la línea NKL tiene un peso molecular aproximado de 64 y 75 Kd. Así todos estos datos muestran que PSK e IL-2 utilizan

diferentes receptores que inducen distintas señales intracelulares, esto también podría ocurrir con LACE.

Esta actividad de aumento de proliferación de la línea NKL en presencia de LACE, también se presenta cuando se cultivan linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica (PBLs), con este extracto. Del mismo modo que la línea leucémica, los PBLs en cultivo son incapaces de crecer *in vitro* por sí solos, necesitando de IL-2 o de mitogénicos como Concanavalina A o Fitohemaglutinina para proliferar. En los ensayos de proliferación de PBLs se han encontrado un aumento de la proliferación de linfocitos de hasta 5 veces superior al control, y representa un 20-35% respecto a la Concanavalina A, que es una sustancia fitoquímica a la que se le conoce un gran potencial inmunomodulador pero tiene, como contrapartida, una gran toxicidad *in vivo* por lo que no puede utilizarse con fines terapéuticos en humanos (**Figura 8**). Hay que destacar que esta proliferación se origina sin estar los PBLs previamente estimulados con ningún mitógeno. El extracto de caléndula sin tratar con láser, CE, muestra unos niveles similares de proliferación de PBLs.

Tenemos que destacar este doble efecto de LACE, por una parte su acción citotóxica sobre células tumorales y por otra parte una acción mitógena sobre linfocitos. Este hecho es el que difiere a LACE de otros productos quimioterapéuticos.

Buscando la esterilización del extracto se sometió a atomización a 80°C y 120°C. Cuando la actividad mitogénica de los diferentes extractos fue comparada, se observó que el incremento de proliferación es superior en el extracto acuoso que en los atomizados, no obteniéndose prácticamente aumento de proliferación de PBLs con el atomizado a 120° (**Figura 9**). Los resultados muestran que este proceso de atomización destruye la actividad mitógena del extracto.

Las subpoblaciones linfocitarias que proliferaron *in vitro* en presencia de LACE fueron: linfocitos B, linfocitos T CD4+ y linfocitos NKT. La expresión de marcadores de proliferación, HLA-DR y CD69, en estas subpoblaciones indicaron que estos linfocitos están activados (**Figura 11**). Al estudiar este efecto mitogénico *in vivo* en ratones tratados con LACE vía oral o intraperitoneal se observó del mismo modo que ocurría en los ensayos *in vitro* un aumento de las subpoblaciones de linfocitos B y T CD4+ en ratones tratados con LACE vía oral. En el grupo tratado tanto vía oral como intraperitoneal se produce un aumento de la subpoblación de linfocitos NKT (**Figura 22**). Con las dosis de LACE empleadas para conseguir estos efectos, no hemos encontrado toxicidad en animales.

Se ha estudiado la actividad inmunomoduladora *in vitro* de múltiples extractos derivados de plantas como: *Silybum marianum*, *Matricaria chamomilla*, *Cichorium intybus* (Amirghofran y cols, 2000), *Plantago lanceolata*, *Rudbeckia fulgida*, *Salvia officinalis*, *Valeriana officinalis* (Ebringerova y cols, 2003), *Dioscorea batatas* (Choi y cols, 2004); y la actividad inmunomoduladora *in vivo* de extractos como *Boerhaavia diffusa* (Mungantiwar y cols, 1999), *Alsophila spinulosa* (*Cyatheaceae*) (Kao y cols, 1994), *Croton macrostachyus*, *Cortón megalocarpus* (*Eugphorbiaceae*), *Phytolacca dodecandra* (*Phytolaccaceae*) (Tachibana y cols, 1993). Los extractos mencionados muestran una actividad mitogénica sobre linfocitos *in vivo* y/o *in vitro*, pero no presentan una actividad antitumoral añadida, como en el caso de LACE.

Polisacáridos derivados de plantas también han mostrado una acción inmunoestimuladora, antitumoral (*Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune*, *Cetraria islandica*,...) o antiinflamatoria (Smestad B, 2001). Se han identificado diferentes tipos de polisacáridos aislados de plantas usados en la medicina tradicional:

arabinanos (*Zozyphus jujuba*, *B. Falcatum*, *Viscum album*, *Panax ginseng*,...), arabinogalactanos (*Arnica montana*, *Angelica acutiloba*, *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpurea*, *Malva verticillata*...), ranogalactanos y ranogalacturonanos (Yamaha H y cols, 1999). Estos polímeros también han mostrado efectos en macrófagos, linfocitos T y células NK. Además una gran variedad de extractos polisacáridos derivados de hongos como *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Inonotus obliquus*, *Acanthopanax senticosus*,... (Pols y cols, 2003; Ernest, 2004; Sawyers, 2004; Shukla, 2004; Yoon y cols, 2004; Takaray y cols, 2005; Shinya y cols, 2005) presentan una actividad citotóxica, pero esta no es directa sino que el efecto antitumoral se ocasiona por activación de la respuesta inmune en el huésped, al estimular las células NK, células T, células B y macrófagos. Esto se ha verificado en muchos ensayos en los que se pierde el efecto antitumoral en ratones timectomizados (Ooi y cols, 1999).

El cáncer es la consecuencia de alteraciones en los procesos de señalización que en definitiva generan el control del crecimiento celular (Singh y cols, 2002). En este aspecto es de suma importancia el ciclo celular, proceso que permite finalmente a la célula dividirse y donde intervienen decisivamente tanto señales de activación positivas como son las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y sus subunidades reguladoras (ciclinas), como proteínas inhibidoras de las anteriores CDKs (familias INK y CIP7KIP). El efecto citostático de esta planta junto con su actividad proliferativa sobre PBLs y la línea NKL, queda reflejado en el ciclo celular. Tras cultivarse las líneas tumorales y los PBLs en presencia del extracto, encontramos por una parte una parada de las células tumorales tratadas con LACE en la fase G_0/G_1 a expensas de la fase S (**Figura 16 y Tabla 10**), y una reentrada en ciclo celular de PBLs humanos y de la línea NKL que

se encuentran en fase G_2/M cuando son cultivados *in vitro* en ausencia de mitógenos (**Figura 10**).

La entrada de las células en ciclo celular es compleja y se inicia con la fosforilización de la proteína retinoblastoma lo que permite liberar el factor de transcripción E2F/DP1. Este fenómeno se encuentra catalizado por la acción de la ciclina D que a su vez necesita acoplarse a la quinasa dependiente de ciclina CDK4/6 (**Figura 6**). Este complejo ciclina D/CDK4/6, se encuentra regulado por genes supresores del grupo p16INK4A y p21cip1. Posteriormente, entran en acción la ciclina E, la ciclina A y la ciclina B. Esta parada del ciclo en el caso de las líneas tumorales, queda explicada por las alteraciones en factores transcripcionales ocasionados cuando se cultivan *in vitro* células tumorales en presencia del extracto. Las ciclinas A, D, E que regulan el paso de las células de la fase G1 a la fase S, presentan una disminución de su expresión en las células tratadas con LACE. Por el contrario, la ciclina B que es un regulador crítico de la mitosis no mostró diferencias entre las células cultivadas en presencia o ausencia de LACE (**Figura 18 y 19**).

En el análisis de factores transcripcionales unidos al DNA se observó un descenso de los factores DP-1, E2F-1, E2F-2 en las líneas AGS y JURKAT (**Figura 20**). Por el contrario, los complejos Rb-E2F fueron más elevados en las células tratadas que en las controles. Estos complejos son inactivos bloqueando a las células en la fase G_0/G_1 e impidiendo así el paso de las células a la fase S. Los niveles de expresión de la proteína p107, fueron superiores en las células cultivadas con el extracto (**Figura 20**).

El estudio de ciclinas dependientes de kinasas (Cdk), Cdk2, Cdk4, Cdk1/Cdc2 reveló una menor expresión en las células tratadas con LACE (**Figura 19**). Estas proteínas están implicadas en la regulación de la fase G_0/G_1 y su activación es necesaria para

la progresión de las células a la fase S. PCNA (proliferating cell nuclear antigen) experimenta una disminución de expresión en las células cultivadas con LACE. En condiciones normales, los niveles más elevados de esta proteína se presentan durante la fase S siendo indetectable en otras fases del ciclo. PCNA ha sido extensamente usado en estudios, asociándose con el pronóstico de la regresión del tumor y la proliferación de neoplasias (John y cols, 2001).

Las proteínas de retinoblastoma totales Rb, Rb2, y RBBP (retinoblastoma-binding protein) presentan una expresión inferior en células tratada con LACE respecto a las células controles pero en cambio, el Rb unido al DNA que es el que se encuentra hipofosforilado y el que bloquea a la célula en la fase G₁ se encuentra aumentado en las células tratadas con LACE. Para que la célula pueda entrar en la fase S se necesita la fosforilación de Rb y de esta manera se liberan los factores E2F o DP1 necesarios para la expresión de genes implicados en la fase S (**Figura 19 y 20**).

Las proteínas p19 y p36 no mostraron diferencias entre las células tratadas y no tratadas con LACE. La proteína p19 juega un papel esencial en los complejos kinasas de la fase S y la p36, es una proteína de 36 KDa que funciona como una kinasa que activa Cdk (**Figura 19**).

La mayoría de agentes antitumorales derivados de plantas ejercen su acción por inducción de apoptosis de células tumorales (Lowe y cols, 2000; Jo y cols, 2005; Kundu y cols, 2005). Entre las proteasas implicadas en los procesos de muerte celular se encuentran las caspasas (1-14), las cuales hidrolizan sustratos selectivos. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo. Son las verdaderas ejecutoras de la apoptosis y numerosas evidencias

han demostrado que la inhibición de las caspasas reduce la apoptosis celular inducida por diferentes estímulos. La parada celular encontrada cuando se cultivan *in vitro* las células tumorales con LACE genera una subpoblación por debajo de G₁. En algunas de las líneas tumorales estudiadas como el fibrosarcoma murino B9, el carcinoma gástrico AGS, el carcinoma de pulmón A549 o el carcinoma de cérvix HeLa, el cultivo con LACE induce un incremento de apoptosis medido por anexina-V (**Figura 16 y Tabla 10**). El mecanismo de inducción de apoptosis vía caspasa-3 está implicado en algunas células tumorales tratadas con LACE, como en la AGS, pero no en todas (**Figura 17**), sugiriendo diferentes mecanismos moleculares de apoptosis en las distintas líneas celulares tumorales.

Muchos productos naturales presentan una actividad citotóxica semejante a la *Caléndula officinalis*. Así *Magnolia Officinalis*, presenta del mismo modo que la caléndula una actividad citotóxica *in vitro* e *in vivo*, con una parada en fase G₁ y una inducción de la apoptosis por caspasas (Chen y cols, 2004). En la actualidad se emplean en la clínica citostáticos de origen vegetal como: alcaloides del podófilo (etopósido, tenipósido), alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina, vindesina, vincrelbina), derivados de camptotecina (irinotecan, topotecan) o taxoides (docetaxel, paclitaxel). El paclitaxel (taxol) constituye en la actualidad una de las principales armas terapéuticas en el tratamiento quimioterapéutico del cáncer de ovario, mama, pulmón no microcítico, próstata e incluso inhibe la metástasis de distintos tumores como melanomas (Crown y cols, 2000; Abal y cols, 2003). Este citostático también ha sido aislado de un árbol, *Taxus brevifolia*. Actúa promoviendo la formación de microtúbulos al unirse a la β -tubulina formándose estructuras microtubulares anómalas o excesivamente estables que no pueden participar en

la mitosis presentándose un acúmulo de células en la fase G₂-M (Crown y cols, 2000; Abal y cols, 2003). Al igual que el extracto de caléndula taxol induce también apoptosis mediada por caspasa, en este caso la caspasa implicada es la caspasa 10 (Park, 2004). A altas concentraciones, paclitaxel también estimula la liberación del factor de necrosis tumoral α y de IL-1 en ratón y activa la expresión de IL-8 en células de pulmón y ovario (Collins y cols, 2000; Wang y cols, 2000; Wang y cols, 2003; Oberlie y cols, 2004). Pero a diferencia del extracto de caléndula, paclitaxel, no estimula la proliferación de linfocitos, todo lo contrario, presenta mielotoxicidad (Oberlie y cols, 2004).

Otros fitoquímicos citostáticos como *Calophyllum brasiliense* inhibe el crecimiento *in vitro* de varias líneas leucémicas con una parada de las células en fase G₁/S e induce apoptosis mediada por caspasa 2, caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9 (Kimura y cols, 2005). Un extracto de *Angelica gigas* ha mostrado un efecto antiproliferativo en líneas de carcinoma de próstata, con acúmulo de células en fase G₁, una inducción de apoptosis vía caspasa 3 y 9 y un descenso de las ciclinas dependientes de kinasas (CDK2, CDK4, CDK6) y de las ciclinas D1 y E (Yin y cols, 2005). Algunos componentes del té verde (catechin) también han mostrado inducir apoptosis vía caspasa-3 y caspasa-9 de varias líneas leucémicas de células B (Nakazato y cols, 2005) al igual que ocurre con LACE.

Un importante dato encontrado en este estudio es la baja toxicidad *in vivo* que presenta este extracto siendo la DL₅₀ de 550 mg/Kg de peso en las tres cepas de ratones estudiadas y de 2750 mg/Kg de peso en ratas Wistar. Es decir, este producto es seguro a dosis terapéuticas y la DL₅₀, varía entre especies (mayor en ratas Wistar que en ratones) pero no entre distintas cepas **(Figuras 21)**.

Tras realizar los ensayos de seguridad *in vivo* se realizaron ensayos de crecimiento local en ratones a los que se les administró LACE. En ratones inmunocompetentes (C57/BL6) se administró LACE vía oral e intraperitoneal un día después de la inyección de las células tumorales hasta el final del ensayo. El grupo de ratones a los que se les administró LACE vía oral presentó unas medias inferiores al control, equivalentes a una inhibición del crecimiento tumoral entre un 7% a un 35%, siendo al final del estudio el porcentaje de inhibición de un 10% aproximadamente. Cuando se administró LACE vía intraperitoneal, se observó un menor tamaño tumoral desde el primer día que se observa crecimiento tumoral, presentándose una inhibición de un 38.7%. Al final del estudio los valores de inhibición representan un 44.4% respecto al control. Como control positivo, se utiliza un grupo de ratones a los que se les administra taxol, presentando un menor tamaño tumoral desde el primer día que se observa crecimiento del tumor, con unos porcentajes de inhibición entorno a un 24% (**Figura 23**).

El crecimiento tumoral local fue evaluado también en ratones atímicos tratados con LACE. Se emplearon células del melanoma humano ANDO-2 y a los ratones se les administró LACE vía oral e intraperitoneal desde el mismo día que se inyectaron las células tumorales hasta el día 70 en el grupo intraperitoneal y hasta el día 90 en el grupo oral. Se observaron diferencias en cuanto al comienzo del crecimiento tumoral, siendo menor en los grupos tratados con LACE o taxol respecto al control. El grupo control presenta un crecimiento más acelerado a partir del día 50, en cambio los grupos de LACE oral, intraperitoneal o taxol, mostraron un crecimiento más acelerado a partir del día 90. Hay que destacar que precisamente cuando empieza a acelerarse el crecimiento tumoral es cuando se suspendió la administración

de LACE. A los ratones a los que se les administró LACE vía oral la proliferación conseguida es menor respecto al control, llegando hasta un 60% de inhibición, siendo al final del ensayo, el porcentaje de inhibición de un 38%. Cuando se administró LACE vía intraperitoneal, también se observó un crecimiento tumoral inferior respecto al control, de hasta un 61.5%. En el caso de la administración de taxol vía intraperitoneal, los valores de crecimiento tumoral son inferiores al control, de hasta un 59%. Esta disminución del crecimiento se mantiene hasta el final del ensayo, donde existe una inhibición del crecimiento de un 34.21%. **(Figura 24 y Tabla 11)**. Con los resultados obtenidos podemos concluir que LACE tanto administrado por vía oral como intraperitoneal alcanza unos niveles de inhibición del crecimiento tumoral semejantes al taxol. Además de presentar estos llamativos porcentajes de inhibición, al evaluar la supervivencia de los ratones nude se observó una mayor supervivencia en el grupo de ratones tratados con LACE vía oral que fue de un 75%, de un 60% el grupo al que se le administró LACE vía intraperitoneal y un 40% en el grupo tratado con taxol. Todos los animales del grupo control murieron al final del ensayo. En el grupo control el primer éxitus se produce unos 25 días antes respecto a los grupos tratados con LACE o taxol, así cuando sucede la primera muerte en el grupo de LACE vía oral o intraperitoneal, el 50% de los ratones controles ya han fallecido **(Figura 25)**.

En realidad, los mecanismos biológicos que median la actividad biológica de la mayoría de las plantas todavía no se conocen claramente. En el caso de nuestro extracto, no conocemos si es un único principio activo o son varios los que median su doble actividad. Se deberán de realizar purificaciones del extracto LACE para identificar sus principios activos. Si sabemos que la caléndula es rica en flavonoides y en otros

compuestos como terpenos. Los flavonoides presentan una amplia variedad de propiedades biológicas beneficiosas: antimutagénicas, anticarcinogénicas y antioxidantes (Kanadaswani y cols, 2005; Hoensch y cols, 2005). Diversas plantas ricas en flavonoides se utilizan en la medicina asiática como agentes terapéuticos desde hace años, donde la incidencia de cáncer de próstata, colon y mama es menor. Trabajos *in vitro* con flavonoides han mostrado un efecto antitumoral al inhibir el crecimiento del ciclo celular vía quinasas, inducir apoptosis y suprimir la secreción de metaloproteinasas y de la invasión tumoral. También inactivan radicales libres y previenen la lípido-peroxidación. Estudios *in vivo* muestran que una dieta rica en flavonoides mejora la actividad antitumoral (Kanadaswani y cols, 2005) e incluso estudios epidemiológicos recientes han mostrado que una dieta rica en frutas y verduras previenen la aparición de neoplasias intestinales (Hoensch y cols, 2005). Un ejemplo de esta acción de los flavonoides es el flavonoide silibinina, que ha mostrado una inhibición *in vitro* e *in vivo* de células de carcinoma pulmonar con una disminución de los efectos secundarios originados por el tratamiento de estos tumores con doxorubicina (Singh y cols, 2004); otro ejemplo es el isoflavonoide derivado de genistein (fenoxodiol) que presenta un efecto antiproliferativo por inducción de apoptosis, con un acúmulo de células en fase G₁ (Agüero y cols, 2005).

También la caléndula es rica en tripterpenos que han mostrado propiedades antiinflamatorias (Akihisa y cols, 1996). El tripterpeno más activo es un monoéster de faradiol (Barnes y cols, 2002). Un extracto orgánico de Caléndula ha mostrado inhibir incluso la replicación del VIH (Kalvatchevty y cols, 1997).

En términos generales, en la estrategia contra el desarrollo del cáncer, el efecto que produce la mayoría de los agentes

antineoplásicos es daño al DNA, al aparato mitótico, a las topoisomerasas, o inhiben la síntesis o incorporación de precursores del DNA. Los puntos de control del ciclo celular representan una buena opción para la aplicación de los agentes quimioterapéuticos. El extracto de caléndula con su acción citostática tanto *in vivo* como *in vitro* induciendo parada del ciclo celular en fase G₁ y con modificaciones de proteínas implicadas en el ciclo celular, puede ser de gran interés en la lucha contra el cáncer. Además hay que destacar su acción inmunomoduladora *in vivo* e *in vitro* con un aumento de linfocitos y NKT, implicados en la inmunología tumoral. Con las dosis utilizadas en los ensayos *in vivo*, no se observa ningún tipo de toxicidad ni cambio de comportamiento en los animales y sí se presenta una actividad antitumoral semejante a citostáticos conocidos como el paclitaxel, junto con un aumento de subpoblaciones linfocitarias. De esta manera, este extracto de caléndula podría emplearse en un futuro en ensayos clínicos como agente quimioterapéutico en pacientes oncológicos y como terapia adyuvante en pacientes con infecciones virales o con inmunodeficiencias adquiridas como el SIDA.

Conclusiones

1.- El extracto de *caléndula*, LACE, ha mostrado *in vitro* una actividad mitogénica en linfocitos humanos de sangre periférica, con un aumento de linfocitos TCD4+, linfocitos B y células NKT. Este incremento de subpoblaciones linfocitarias también fue observado en ensayos *in vivo* tras administrar LACE a los animales.

2.- LACE induce *in vitro* una inhibición de la proliferación de líneas celulares tumorales derivadas de tumores sólidos y de leucemias. Esta inhibición llega a alcanzar prácticamente un 100% en la mayoría de líneas estudiadas.

3.- El tratamiento del extracto de *caléndula* con láser es necesario para alcanzar estos niveles de actividad citotóxica *in vitro* en las líneas celulares tumorales.

4.- La inhibición de la proliferación en células tumorales se debe a una parada del ciclo celular en la fase G₀/G₁ y a un aumento de la apoptosis. Por el contrario, en PBLs (linfocitos de sangre periférica) nos encontramos que LACE produce la reentrada en el ciclo celular de estas células.

5.- Los estudios de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular muestran que LACE produce un descenso en los niveles de expresión de: ciclinas A, D1, y E; CDKs 1, 2 y 4; y de los factores transcripcionales, E2F-1, E2F-2 y DP-1. Asimismo, se incrementa la cantidad de la proteína del Rb unida al DNA.

6.- En los ensayos *in vivo* se ha observado que LACE presenta muy baja toxicidad, no siendo tóxico a las dosis terapéuticas normalmente utilizadas.

7.- En estudios de la actividad antitumoral *in vivo* en los modelos murinos con ratones inmunocompetentes, B16 y ratones atímicos, ANDO-2, LACE ha mostrado una disminución del crecimiento tumoral de hasta un 40% y un 60% respectivamente. Además, en los ratones tratados con este extracto se encontró una tasas más altas de supervivencia, mostrando diferencias significativas con respecto a los controles.

Bibliografia

-
- Abal M, Andreu JM, Barasoain I (2003). Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of actin. *Curr Cancer Drug Targets*, 3 (3): 193-203.
 - Agüero M, Facchinetti M, Sheleg Z, Senderowicz A (2005). Phenoxodiol, a novel isoflavone, induces G₁ arrest by specific loss in cyclin-dependent kinase 2 activity by p53-independent induction of p21^{WAF/CIP1}. *Cancer Research*, 65(8): 3364-3373.
 - Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H (1996). Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, 43: 1255-1260.
 - Algarra I, Collado A, Garrido F (1997). Protein-bound polysaccharide PSK abrogates more efficiently experimental metastases derived from H-2 negative than from H-2 positive fibrosarcoma tumor clones. *J Exp Clin Cancer Res*, 16: 373-380.
 - Algarra I, García-Lora A, Collado A, Garrido F (1999). Differential effect of protein-bound polysaccharide (PSK) on survival of experimental murine tumors. *J Exp Clin Cancer Res*, 18: 39-46.
 - Algarra I, García-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello, Garrido F (2004). The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother*, 53 (10): 904-910.
 - Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JL, Known E, Carbone DP, Gabrilovich DI (2000). Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res*, 6: 1755-1766.
 - Amirghofran Z, Azadbacht H, Karimi M (2000). Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 167-172.
 - Aozuka Y, Koizumi K, Saitoh Y, Ueda Y, Sakurai H, Saiki I (2004). Anti-tumor angiogenesis effect of aminopeptidase inhibitor

bestatin against B16-BL6 melanoma cells orthotopically implanted into syngeneic mice. *Cancer letters*, 216: 35-42.

- Bai X, Cerimele F, Ushio-Fukai (2003). Hookiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo. *J Biol Chem*, 278: 35501-35507.

- Bakó E, Deli J, Toth G (2002). HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*, 53: 241-250.

- Ballen K, Stewart FM (1997). Adoptive immunotherapy. *Curr. Op. Oncol*, 9: 579-583.

- Barbour EK, Sagherian V, Talhouk S, Talhouk R, Farran MT, Sleiman FT, Harakeh S (2004). Evaluation of homeopathy in broiler chickens exposed to live viral vaccines and administered *Calendula officinalis* extract. *Med Sci Monit*; 10 (8): 281-288.

- Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG (2005). Radiation and the microenvironment-tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer*, 5(11): 867-875.

- Baselga J (2001). Targeting the epidermal growth factor receptor: a clinical reality. *J Clin Oncol* ,19 (18): 41S-44S.

- Bekaii-Saab TS, Villalona-Calero MA (2005). Preclinical experience with docetaxel in gastrointestinal cancers. *Semin. Oncol*, 32(2): S3-S9.

- Ben-Efrain S (1999). One hundred years of cancer Immunotherapy. A critical appraisal. *Tumor Biol*, 20: 1-24.

- Bernstein L, Henderson BE (1996). Exogenous hormones. En: Schottenfeld D, Fraumeni J, eds. *Cancer Epidemiology and Prevention*. New York: Oxford University Press. 462-488.

- Berrino F, Capocaccia R, Coleman MP, Estève J, Gatta G, Hakulinen T (2003). Survival of Cancer Patients in Europe: Eurocare-3 Study. *Ann Oncol*, 14 (Suppl 5).

- Bhattacharyya A, Lahiry L, Mandal D (2005). Black tea induces tumor cell apoptosis by Bax translocation, loss in mitochondrial transmembrane potential, cytochrome c release and caspase activation. *Int J Cancer*, 117(2): 308-315.
- Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrar P, Sliman N, Norat T (2003). European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in 184 the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*, 361:1496-1501.
- Boon T, Cerottini JC, Van den Eynden B, Van der Bruggen P, Van Pel A (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 337-365.
- Boucaud-Maitre Y, Algernon O, Raynaud J (1988). Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extract. *Pharmazie*, 43: 220-221.
- Borchers AT, Stern JS, Hackman RM, Keen CL, Gershwin EM (1999). Mushrooms, tumors, and immunity. *Soc Exp Bio Med*, 221: 2281-2293.
- Bulavin DV, Amudson SA, Fornace AJ (2002). P38 and Chk1 Kinases: different conductors for the G2/M checkpoint symphony. *Curr Opin Genet Dev*, 12: 92-97.
- Buteau Ch, Suetomir N, Markovic, Celis E (2002). Challenges in the development of effective peptide vaccines for cancer. *M. Clin Proc*, 77: 339-349.
- Camí J, Suñen E, Carbó JM, Coma L (2002). Producción Científica Española en Biomedicina y Ciencias de la Salud (1994-2000). Informe del Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigación Sanitaria.

- Cao Q, Lin Z (2004). Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide. *Acta Pharmacol*, 25(6): 833-838.
- Carson CT (2003). The Mre11 complex is required for ATM activation by DNA damage. *EMBO J*, 22: 6610-6620.
- Chappell DB, Zaks TZ, Rosenber SA, Restifo NP (1999). Human melanoma cells do not express Fas (Apo-1/CD95) ligand. *Cancer Res*, 59: 59-62.
- Chattopadhyay U (1999). Tumor immunotherapy: developments and strategies. *Immunol Today*, 20: 480-482.
- Chen F, Wang T, Wu Y, Gu Y (2004). Honokiol: a potent chemotherapy candidate for human colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 10(23): 3459-3463.
- Chihara G (1981). The antitumor polysaccharide Lentinan: an overview. In: Aoki T et al (eds). *Manipulation of host defence mechanisms. Excerpta Med, Int Cong. Ser 576*, Elsevier. Amsterdam.
- Choi EM, Koo S, Hwang J (2004). Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). *Journal of ethnopharmacology*, 91: 1-6.
- Classon M, Dyson N (2001). P107 and P130 versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell. Res*, 264(1): 135-147.
- Collins TS, Lee LF, Ting JP (2000). Paclitaxel up-regulates interleukin-8 synthesis in human lung carcinoma through and NF-KB and AP-1 dependent mechanism. *Cancer Immunol Immunother*, 49: 78-84.
- Cordova CA, Siqueira IR, Netto CA (2002). Protective properties of butanolic extract of *Calendula Officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. *Redox Rep*, 7(2): 95-102.

- Crown J, Leary M (2000). The taxanes: an update. *Lancet*, 355: 1176-1178.
- Danial NN, Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116: 205-219.
- De Libero G, Mori L, Sacchi A, Donda A, Shamshiev A, Gober HJ, Michielin O, Sonnino S (2001). T cell recognition of glycolipids: molecular requirements for immunogenicity. *Biotec Aplicada*, 18: 35.
- De Vries TJ, Fourkour A, Wobbes T, Verkroost G, Ruitter DJ, Van Muijen GN (1997). Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res*, 57: 3223-3229.
- Ebringerova A, Kardosova A, Hromadkova Z, Hribalova V (2003). Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fitoterapia*, 74: 52-61.
- Ehrlich P (1909). Ueber den jetzigen stand der Zarinomforschung. *Ned Tijdschr. Geneesk*, 5: 373-390.
- Eischen CM, Packham G, Nip J, Fee BE, Hiebert SW, Zambetti GP, Cleveland JL (2001). Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-myc and E2F-1. *Oncogene*, 20: 6983-6993.
- Eun Mi Choi, Sung Ja Koo, Ja-Kwan Hwang (2004). Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). *Journal of Ethnopharmacology*, 91: 1-6.
- Evan GI, Vousden KH (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411: 342-348.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM (2004). *Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. IARC Cancer Base n°5, version 2.0 Lyon IARC Press.
- Fidler I, Hart I (1982). Biological diversity in metastatic neoplasm: origins and implications. *Science*, 217: 998-1003.

- Fisher M, Yang LX (2002). Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy. *Anticancer Res*, 22: 17-37
- Ford JM (2004). *Clinical Oncology*, 11: 191-205.
- Fridman JS, Lowe SW (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22: 9030-9040.
- Fushida S, Nao F, Kinami S (2002). Pharmacologic study of intraperitoneal docetaxel in gastric cancer patients with peritoneal dissemination. *Gan To Kagaku Ryoho*, 29: 1759-1763.
- García-Lora A, Pedrinaci S, Garrido F (2001). Protein-bound polysaccharide K and interleukin-2 regulate different nuclear transcription factors in the NKL human natural killer cell line. *Cancer Immunol Immunother*, 50: 191-198.
- García-Lora A, Martínez M, Pedrinaci S, Garrido F (2003). Different regulation of PKC isoenzymes and MAPK by PSK and IL-2 in the proliferative and cytotoxic activities of the NKL human natural killer cell line. *Cancer Immunol Immunother*, 52: 59-64.
- García-Lora A, Martínez M, Algarra I, Gaforio J, Garrido F (2003b). MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components. *Int J Cancer*, 106: 521-527.
- Garrido F, Festenstein H, Schirmacher V (1976). Further evidence for depression of H-2 and Ia-like specificities of foreign haplotypes in mouse tumour cell lines. *Nature*, 261: 705-707.
- Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL (1993). Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today*, 14: 491-499.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*, 18: 89-95.

- Garrido F, Algarra I (2001). MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res*, 83: 117-158.
- Gelmon KA, Eisenhauer EA, Harris AL (1999). Anticancer agents targeting signalling molecules and cancer cell environment: challenges for drug development?. *J Nat Cancer Inst*, 91: 1281-1287.
- Ghobrial IM; Witzig TE, Adjei AA (2005). Targeting apoptosis pathways. *Cancer therapy*, 55(3): 178-94.
- Gibbs JB (2000). Mechanism based target identification and drug discovery in cancer research. *Science*, 287: 1969-1972,
- Godfrey D, Kronenberg M (2004). Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(10): 1379-1388.
- Gómez-Lázaro M, Fernández Gómez FJ, Jordan J (2004). P53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *J. Physiol Biochem*, 60(4): 287-307.
- González G, Crombet T, Torres F, García B, Mulet A (2001). Epidermal Growth Factor-based vaccine: results of clinical trials in patients with epidermoid origen tumors. *Biotech Aplicada*.
- Graeza L, Szasz K (1968). Examination of active agents of petal of marigold (*Calendula officinalis* L). *Acta Pharm Hung*, 38 (2): 118-125.
- Hankins LK, Lemoine NR, Kim D (2002). Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform. *The Lancet Oncology*, 2(4): 239-248.
- Hertz J, Schell G, Doerfler W (1999). Factors affecting de novo methylation of foreign DNA in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem*, 274: 24232-24240.
- Hirano T, Gotoh M, Oka K (1994). Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60cells. *Life Sci*, 55: 1061-1069.

- Hobbs C (1995). Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing and culture. Botanica Press, Santa Cruz, Calif.
- Hoensch HP, Kirch W (2005). Potencial role of flavonoids in the prevention of intestinal neoplasia: a review of their mode of action and their clinical perspectives. Int. J. Gastrointest. Cancer, 35(3): 187-195.
- Horwitz SB (1994). Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. Ann. Oncol., 5: S-3- S-6.
- Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM (1998). Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and downregulation of interleukin 12. Cancer Res, 58: 1208-1216.
- Huang Z (2000). Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. Oncogene, 19: 6627-6631.
- Huerta S, Arteaga J, Irwin R (2002). PC-SPES inhibits colon cancer growth in vitro and in vivo. Cancer Research, 62: 5204-5209.
- Ikekawa T (2001). Beneficial effect of edible and medicinal mushrooms in health care. Int J Med Mushrooms, 3: 291-298
- Ikekawa T, Ikeda Y, Yoshioka Y, Nakanishi K, Yokoyama E, Yamazaki E (1982). Antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* 2. The structure of EA-3 and further purification of EA-5. J Pharmacobiol Dyn, 5: 576-581.
- Ikekawa T, Saitoh H, Feng W, Zhang H, Li L, Matsuzawa T (1992). Antitumor activity of extracts and polysaccharides. Chem Pharm Bull, 40: 1954-1957.
- Ikezoe T, Chen S, Heber D (2001). Baicalin is a major component of PC-SPES wich inhibits the proliferation of human cancer cells via apoptosis and cell cycle arrest. Prostate, 49: 285-292.

- Itichi s, Yamano Y, Osame M, Hall WW (1996). A kinetic comparative study on lymphocyte responses to superantigen and phytohemagglutinin: reciprocal presentation of superantigen on surface of activated lymphocytes. *Cell Immunol*, 173 (2): 312-316.
- Jacquet P, Stuart OA, Chang D (1996). Effects of intraabdominal pressure on pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin after intraperitoneal administration. *Anticancer Drugs*, 7: 596-603.
- Jo EH, Kin SH, Ra JC, Kim SR, Cho SD, Jung JW y cols (2005). Chemopreventive properties of the ethanol extract of Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett*, 230: 239-247.
- John PC; Mews M, Moore R (2001). Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progresion and mitotic divison. *Protoplasm*, 216: 119-142.
- Kalvathev Z, Walder R, Garzaro D (1997). Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomed. Pharmacother*, 51: 176-180.
- Kanadaswani C, Lee LT; Lee PP (2005). The antitumoral activities of flavonoids. *In vivo*, 19(5): 895-909.
- Kao SF, Kuo HL, Lee YC (1994). Immunostimulation by *Alsophila spinulosa* extract fraction VII of both humoral and cellular immune responses. *Anticancer Res*, 14(6B): 2439-2443.
- Kastan M, Barkak J (2004). Cell cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 32: 316-323.
- Kimura S, Ito C, Jyoko Naoto, Segawa H, kuroda J, Okada M, Adachi S, Nakahata T, Yuasa T, Filho VC, Furuhawa F, Haekawa T (2005). Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *Int. J. Cancer*, 113: 158-165.

- Kiss R, Camby I, Duckworth D, De-Deker R, Salmon I (1997). In vitro influence of Phascolus vulgaris, Griffonia simplicifolia, Concanavalin A, wheat germ and peanut agglutinins on HCT-15, Lovo and SW 837 human colorectal cancer cell growth. *Gut*, 40 (2): 253-261.
- Klein G (1966). Tumor antigens. *Annu Rev Microbiol* 20, 223-52.
- Kobayashi H, Matsunaga K, Oguchi Y (1995). Antimetastatic effects of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide obtained from basidiomycetes: an overview. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 4: 275-281.
- Korn EL, Arbuck SG, Pluda JM (2001). Clinical trial designs for cytostatic agents: Are new approaches hended. *J Clin Oncol*, 19: 265-272.
- Kuboata T, Hisatake J, Hisatake Y (2000). PC-SPES: a unique inhibitor of proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Prostate*, 42: 163-171.
- Kudo S, Tanaka J, Kashida H, Tamegai Y, Endo S, Yamano HO (2002). Effectiveness of immunochemotherapy with PSK, a protein-bound polysaccharide, in colorectal cancer and changes of tumor marker. *Oncol Rep*, 9: 635-638.
- Kundu T, Dey S, Roy M, Siddiqui M, Bhattacharya RK (2005). Induction of apoptosis in human leukaemia cells by black tea and its polyphenol theaflavin. *Cancer Lett*, 230: 111-121.
- Lee JJ, Swain SM (2005). Development of novel chemotherapeutic agents to evade the mechanisms of multidrug resistance (MDR). *Semin Oncol*. 32(6): S22-S26.
- Lee LF, Haskill JS, Mukaida N (1997). Identification of tumor-specific paclitaxel (Taxol responsive regulatory elements in the interleukin-8 promotor). *Mol. Cell. Biol*, 17: 5097-5105.
- Lee LF, Li G, Templeton DJ, Ting JP (1998). Paclitaxel (Taxol) induced gene expression and cell death are both mediated by the

activation of c-Jun N-terminal Kinase JNK/SAPK. J. Biol. Chem., 273: 28253-28260.

- Leyon PV, Lini CC, Kuttan G (2005). Inhibitory effect of *Boerhaavia diffusa* on experimental metastasis by B16F10 melanoma in C57/BL6 mice. Life Sciences, 76: 1339-1349.
- Liou KT, Shen YC, Chen CF (2003). The antiinflammatory effect of honokiol on neutrophils: mechanisms in the inhibition of reactive oxygen species production. Eur J Pharmacol, 475: 19-27.
- Livingston P (2001). Treatment of cancer in the adjuvant setting with a polyvalent antibody inducing vaccine. Biotech. Aplicada, 18: 37-42.
- López-Abente G y cols (2005). La Situación del Cáncer en España. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, et al (1993). P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell, 74: 957-967.
- Lowe SW, Lin AW (2000). Apoptosis in cancer. Carcinogenesis, 21: 485-495.
- Lowe S, Cepero E, Evan G (2004). Intrinsic tumour suppression. Nature, 432: 307-315.
- Manfredi, J, Horwitz Sb (1984). Taxol: an antimetabolic agent with a unique mechanism of action. Pharmacol Ther, 25: 83-125.
- Mareel M, Van Roy F, de Baetselier P (1990). The invasive phenotypes. Cancer Metastasis Rev, 9 (1): 45-62.
- Massague J (2004). G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 432: 298-306.
- Matsumura I, Tanaka H, Kanakura Y (2003). E2F1 and c-Myc in cell growth and death. Cell cycle, 2: 33-338.
- Meikrantz W, Schlegel R (1996). Suppression of apoptosis by dominant negative mutants of cyclin-dependent protein kinases. J. Biol. Chem, 271: 10205-10209.

-
- Mizuno T (1996). Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. *Foods Ingrid J Jpn*, 167: 69-85.
 - Mizuno T, Zhuang C, Abe K, Okamoto H, Kiho T, Ukai S, Leclerc S, Meijer L (1999). Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. (Aphyllphoromycetideae). *Int J Med Mushrooms*, 1: 301-316.
 - Mizuno T (2002). Medicinal properties and clinical effects on *Agaricus blazei* Murr. *Int J Med Mushrooms*, 4.
 - Munemoto Y, Lida Y, Abe J, Saito H, Fujisawa K, Kasahara I, Mitsui T, Asada Y, Miura S (2002.) Significance of postoperative adjuvant immunochemotherapy after curative resection of colorectal cancers: Association between host or tumor factors and survival. *Int J Oncol* , 20: 403-411.
 - Munemoto Y, lida Y, Ohata K, Saito H, Fujisawa K, Kasahara Y, Mitsui T, Asada Y, Miura S (2004). Significance of postoperative adjuvant immunochemotherapy after curative resection of colorectal cancers: identification of responders incorporating the age factor. *Oncol Rep*, 11: 623-635.
 - Mungantiwar A, Nair A, Shindeau A, Dikshit VJ, Saraf MN, Thakur VS, Sainis KB (1999). Studies on the immunomodulatory effects of *Boerhaavia diffusa* alkaloidal fraction. *Journal of Ethnopharmacology*, 125-131.
 - Munnes M, Patrone G, Schmitz B (1998). *Oncogene*, 17: 2573-2584.
 - Murray AW (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116: 221-234.
 - Nagase H, Ikeda K, Sakai Y (2001). Inhibitory effect of magnolol and honokiol from *Magnolia obovata* on human fibrosarcoma HT-1080. Invasiveness in vitro. *Planta Med*, 67: 705-708.

-
- Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, Mi Kwon Y, Shinozuka K, Kunitomo M (1999). Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* on spontaneous liver metastasis of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells in syngeneic mice. *J Pharmacol*, 79: 335-341.
 - Nakazato T, Ito K, Ikeda Y (2005). Green Tea Component, Catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clinical Cancer Research*, 11: 6040-6049.
 - Naumann F, Remus R, Schmitz B (2004). Gene structure and expression of the 5'- (CGG)-3'-binding protein (CGGBP1). *Genomics*, 83: 108-120.
 - Nishitani H, Iygerou Z (2002). Control of DNA replication licensing in cell cycle. *Genes Cells*, 7(6): 523-534.
 - No autores listados (2001). Final report on the safety assessment of *Caléndula officinalis* extract. *Int J toxicol*, 20(2): 13-20.
 - Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366(1): 2-16.
 - Oberlie NH, Kroll DJ (2004). Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *J Nat Prod*, 67 (2): 129-135.
 - Ockert D, Schmitz M, Hampl M, Rieber EP (1999). Advances in cancer immunotherapy. *Immunol Today*, 20: 63-65.
 - Odot J, Albert P, Carlier A, Tarpin M, Devy J, Madoulet C (2004). In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cell. *Int. J. Cancer*, 111(3): 381-387.
 - Ohwada S, Ikeya T, Yokomori T, Kusaba T, Roppongi T, Takahashi T, Nakamura S, Kakinuma S, Iwazaki S, Ishikawa H, Kawate S, Nakajima T, Morishita Y (2004). Adjuvant immunochemotherapy with oral Tegafur/Uracil plus PSK in patients

- with stage II or III colorectal cancer: a randomised controlled study. *Br J Cancer*, 90: 1003-1010.
- Ooi VE, Liu F (1999). A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *Int J Med Mushrooms*, 1: 195-206.
 - Ooi VE, Liu F (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr Med Chem*, 7: 715-729.
 - Pal SK, Shukla Y (2003). Herbal medicine: current status and the future. *Asian Pac J. Cancer Prev*, 4: 281-288.
 - Palka-Santini M, Schwarz-Herzhe B, Brondke H (2003). The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA proteins. *Mol. Genet. Genomics*, 270: 201-215.
 - Park S, Wu C, Gordon J (2004). Taxol induces caspase 10 dependent apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 51057-51067.
 - Pavletich NP (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activator and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*, 287: 821-828.
 - Pedrinaci S, Algarra I, Garrido F (1999). Protein-bound polysaccharide (PSK) induces cytotoxic activity in the NKL human natural killer cell line. *Int J Clin Lab Res*, 29(4): 135-140.
 - Pellegrino MA, Ferrone S, Reisfeld RA, Irie RF, Golub SH (1977). Expression of histocompatibility (HLA) antigens on tumor cells and normal cells from patients with melanoma. *Cancer*, 40: 36-41.
 - Pérez-Carreón JI, Cruz-Jiménez G, Licea-Vega JA (2002). Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicol. In vitro*, 16(3): 253-258.
 - Pestieau SR, Marchettini P, Stuart OA (2002). Prevention of intraperitoneal adhesions by intraperitoneal 5-fluorouracil: experimental studies. *Int. Surg*, 87: 195-200.

- Prasanth SG, Mendez J, Prasanth KV (2004). Dynamics of pre-replication complex proteins during the cell division cycle. *Phil. Trans. R. Soc. Lond*, 359: 7-16.
- Prendergast G (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene*, 18: 2967-2987.
- Polager S, Kalma Y, BerKovich E, Ginsberg D (2002). E2Fs up-regulate expressions of genes involved in DNA replication; DNA repair and mitosis. *Oncogene*, 21: 437-446.
- Pommier P, Gomez F, Sunyach MP (2004). Phase III Randomized Trial of Calendula Officinalis Compared with Trolamine for the Prevention of Acute Dermatitis During Irradiation for Breast Cancer. *J. Clin. Oncol*, 22: 1447-1453.
- Qui X, Reed D, Hang H (2001). Identification and analysis of a gene from *Calendula officinalis* encoding a fatty acid conjugase. *Plant Physiology*, 125: 847-855.
- Remus R, Zeschnigk M, Zuther I (2005). *Genet Funct Dis*, 2: 171-184.
- Ren B (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication and G2/M checkpoints. *Genes Dev*, 16: 245-256.
- Reshetnikov SV, Wasser Sp, Tan KK (2001) Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *Int J Med Mushrooms*, 3: 361-394.
- Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le JM, Tantravahi R, Ritz J (1996). Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol*, 24: 406-415.
- Rosenberg SA (2001). Progress in human tumour immunology, immunotherapy. *Nature*, 411: 380-384.
- Sakurai M, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H (1999). B-cell proliferation activity of pectic polysaccharide from a medicinal herb,

the roots of *Bupleurum falcatum* L and its structural requirement. *Immunology*, 97: 540-547.

- Sarrel E, Cohen HA, Kahan E (2003). Naturopathic treatment for ear pain in children. *Pediatrics*, 111: 574-579.

- Sarrel E, Mandelberg A, Cohen HA (2001). Efficacy of naturopathic extracts in the management of ear pain associated with acute otitis media. *Arch Pediatr. Adolesc. Med*, 155: 796-799.

- Sawyers C (2004). Targeted cancer therapy. *Nature*, 432: 294-297.

- Sawyers CL (2003). Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer. *Genes Dev*, 17: 2998-3010.

- Schiff P.B, Fant J, Horwitz SB (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277: 665-667.

- Schmaljohann J, Biersack HJ, Guhlke S (2005). Production and therapeutic application of radiopharmaceuticals. *Radiotherapeutics. Pharm. Unserer Zeit*, 34(6): 498-504.

- Schreiber H, Wu TH, Nachman J, Kast WM (2002). Immunodominance and tumor escape. *Semin Cancer Biol*, 12: 25-31.

- Schwartz RH (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*, 248: 1349-56.

- Schwartz GK (2005). Development of cell cycle active drugs for the treatment of gastrointestinal cancers: a new approach to cancer therapy. *J. Clin. Oncol*, 23(20): 4499-4508.

- Sears RC, Nevins JR (2002). Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem*, 277: 11617-11620.

- Sedletska Y, Giraud-Panis MJ, Malinge JM (2005). Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 5(3): 251-265.

- Seo N, Ito T, Wang N, Yao X, Tokura Y, Furukawa F, Takigawa M, Kitanaka S (2005). Anti-allergic Psidium guajava extracts exerts an antitumor effect by inhibition of T regulatory cells and resultant augmentation of Th1 cell. *Anticancer Res*, 25(6 A): 3763-3770.
- Seville LL, Shah N, Westwell AD (2005). Modulation of pRB/E2F functions in the regulation of cell cycle and in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 5(3): 159-170.
- Shapiro GI (2006). Cyclin-dependent Kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol*, 24 (11): 1770-1783.
- Sherr CJ (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, 116: 235-246.
- Shtivelman E, Sussman J, Stoke D (2002). A role for PI 3-kinase and PKB activity in the G2/M Phase of Cell Cycle. *Curr Biol*; 12: 919-924.
- Shukla Y, Pal SK (2004). Complementary and alternative cancer therapies: past, present and the future scenario. *Asian Pac J Cancer Prev*, 5(1): 3-14.
- Singh RP, Dhanalakshmi S, Agarwal R (2002). Phytochemicals cell cycle modulators: a less toxic approach in halting human cancer. *Cell cycle*, 1: 156-161.
- Singh R, Mallikarjuna G.U, Sharma G, Dhanalakshmi, Tyagi A (2004). Oral silibinin inhibits lung tumor growth in athymic nude mice and forms a novel chemocombination with doxorubicin targeting nuclear factor κ B-mediated inducible chemoresistance. *Clinical Cancer Research*, 10: 8641-8647.
- Sliva D, Labarrere C, Slivova S (2002). Ganoderma lucidum suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 298: 603-612.
- Smardova J, Smarda J, Koptikova J (2005). Functional analysis of p53 tumor suppressor in yeast. *Differentiation*, 73(6): 261-77.

- Smetad Paulsen Berit (2001). Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. *Current organic Chemistry*, 5: 939-950.
- Stamets P (2000). *Growing gourmet and medicinal mushrooms*, 3rd edn. Ten Speed Press, Berkeley, Calif.
- Stevaux O, Dyson NJ (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol*, 14: 684-691.
- Straus SE, Jaffe ES, Puch JM, Dale JK, Elkon KB, Rosen-Wolff A, Peter A, Sneller MC, Hallahan CW, Wang J, Fischer RE, Jackson CM, Leonardo MJ (2001). The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*, 98: 194-200.
- Sugarbaker PH, Torres J, Carmignani P (2005). Update on chemotherapeutic agents utilized for perioperative intraperitoneal chemotherapy. *The Oncologist*, 10: 112-122.
- Sugarbaker PH (1996). Early postoperative intraperitoneal adriamycin as an adjuvant treatment for visceral and retroperitoneal sarcoma. In: Sugarbaker PH, ed. *Peritoneal Carcinomatosis: Drugs and Diseases*. Kluwer: Boston, 7-14.
- Sugimachi K, Maechara Y, Ogawa M, Kakegawa T (1997). Dose intensity of uracil and tegafur in postoperative chemotherapy for patients with poorly differentiated gastric cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 40: 233-238.
- Taile A, Hayek O, Buttyan R (1999). Effect of a phytotherapeutic agent, PC-SPES, on prostate cancer: a preliminary investigation on human cell lines and patients. *BJU Int*, 84: 845-850.
- Takaray K, Haribe S, Obata Y (2005). Effects of 19 Herbal extracts on the sensitivity to paclitaxel or 5-Fluoracil in HeLa cells. *Bio Pharm Bull*, 28(1): 138-142.

- Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K (2002). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol*, 214: 194-200.
- Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, Kurisaki T, Suxuki H, Tominaga T (1996). Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer*, 32A: 2513-2519.
- Turriziani A, Mattiucci GC, Montoro C (2005). Radiotherapy-related fatigue: incidence and predictive factors. *Rays*, 30(2): 197-203.
- Tzianabos AO (2000). Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. *Clin Microbiol Rev*, 13: 523-533.
- Urano M, Ling CC (2002). Therm enhancement of melphalan and oxaliplatin cytotoxicity in vitro. *Int J Hyperthermia*, 18: 307-315.
- Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3 dioxygenase. *Nat Med* 9, 1296-1274.
- Van Bree C, Beumer C, Rodermond HM (1999). Effectiveness of 2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) combined with hyperthermia in rat R-1 rhabdomyosarcoma in vitro and in vivo. *Int J Hyperthermia*, 15: 549-556.
- Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254: 1643-7.

- Van Ruth S, Verwaal VJ, Zoetmulder FAN (2003). Pharmacokinetics of intraperitoneal mitomycin C. *Surg Oncol Clin N Am*, 12: 771-780.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman Zn (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol*, 84(10): 627-639.
- Wagner H, Proksch A, Riess-Maurer I (1985). Immunostimulant action of polysaccharide from higher plants. *Arzneimittelforschung*, 34: 659-661.
- Wang F, Coo Y, Zhao W (2003). Taxol inhibits melanoma metastases through apoptosis induction, angiogenesis inhibition and restoration of E-cadherin and nm 23 expression. *Journal of Pharmacological Sciences*, 93: 197-203.
- Wasser S.P (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 60: 258-274.
- Wasser SP, Weis AL (1999). Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *Int J Med Mushrooms*, 1: 31-62.
- Wilasrusmee O, Kittur S, Shah G (2002). Immunostimulatory effect of Silybum Marianum (milk thistle) extract. *Med Sci Monit*, 8(11): 439-443.
- Wimer, B. M (1997). Therapeutic immunostimulating effects of plants mitogens exemplified by the L4 isolectin of PHA. *Cancer Biother Radiopharm*, 12: 195-212.
- Yang JC (2001). Tumor immunology. In: Rich RR, editor. *Clinical Immunology*. 2th ed. London: Mosby, 100.1-100.15.
- Yang SE, Hsieh MT, Tasai TH (2002). Down-modulation of Bcl-XI release of cytochrome c and sequential activation of caspases during honokiol induced apoptosis in human squamous lung cancer CH27 cells. *Biochem Pharmacol*, 63: 1641-1651.

- Yim DI, Singh R, Agarwal C, Lee S, Chi H (2005). A novel anticancer agent, decursin, induce G₁ arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Cancer Reseach*, 65(3): 1035-1044.
- Yoon TJ, et al (2004). Anti-metastatic activity of *Acanthopanax senticosus* extract and its possible immunological mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 93: 247-253.
- Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A (2001). Medical flowers III. Marigold: hipoglycemic, gastric emptying inhibitory and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendosaponins A, B, C and D from Egiptian *Calendula officinalis*. *Chem Pharm Bull*, 49(7): 863-870.
- Zaks TZ, Chappell DB, Rosenberg SA, Restifo NP (1999). Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J. Immunol*, 162: 3273-3279.
- Zarzov P Decittignies A, Balldacci G, Nurse P (2002). G1/S CDK is inhibited to restrain mitotic onset when DNA replication is blocked in fision yeast. *EMBO J*, 21: 337-346.
- Zhu D (1987). Recent advances on the active components in Chinese medicines. *Abstr Chin Med*, 1: 251-286
- Zitterl-Eslseer K, Sosa S, Janernitsch J (1997). Anti-edematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Caléndula officinalis* L). *Journal of Ethnopharmacolog*, 57: 139-144.

